



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Optimización de la prueba de microneutralización
para la detección de anticuerpos neutralizantes contra
el virus del dengue serotipo 2**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo
Parasitólogo**

AUTOR

Lucas Augusto SEVILLA DROZDEK

ASESOR

Enrique Walter MAMANI ZAPANA

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sevilla, L. (2018). *Optimización de la prueba de microneutralización para la detección de anticuerpos neutralizantes contra el virus del dengue serotipo 2*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO PARASITÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 16:39 horas del 10 de enero de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo de LUCAS AUGUSTO SEVILLA DROZDEK.

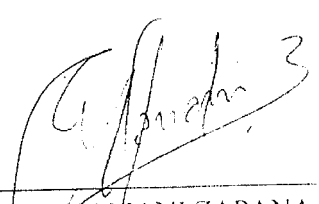
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 028-EPMP-2017, el titulando expuso su tesis: "OPTIMIZACIÓN DE LA PRUEBA DE MICRONEUTRALIZACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA EL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 2", y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18....., calificativo: Aprobado con mención honrosa ✓

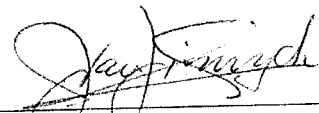
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo a LUCAS AUGUSTO SEVILLA DROZDEK y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

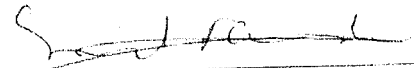
Siendo las 17:55 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 10 de enero de 2018.


Dra. EGMA MAYTA HUATUCO
(PRESIDENTA)


Dr. ENRIQUE MAMANI ZAPANA
(ASESOR)


Dr. JUAN JIMENEZ CHUNGA
(MIEMBRO)


Blgo. MIGUEL TALLEDO RIVERA
(MIEMBRO)

Esta tesis fue llevada a cabo en el laboratorio de Virología clínica y Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos gracias al soporte económico brindado por INNOVATE PERÚ.

DEDICATORIA

En primera instancia a Dios por guiar cada paso que he dado en mi vida ya que cada uno de ellos lo ha conducido con la certeza de que él está a mi lado.

A mis padres Rolin Sevilla y Angelica Drozdek quienes me dieron todo su amor, la vida y sabiduría, gracias por apoyarme en todo momento para ser un profesional con principios y valores. Sin ustedes, mi destino no hubiese sido igual.

A mi hermano Rene, para que siempre siga adelante persiguiendo sus ideales.

Y a ti Rubí, por ser la persona que me acompañó en este largo camino científico, gracias por tu afecto, bondad, paciencia y comprensión que me brindas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Mamani Zapana por la oportunidad de la realización de la tesis y brindarme sus consejos y amistad.

A la Dra. Egma Mayta Huatuco por su confianza, paciencia, amistad que ha depositado hacia mi persona y que me permitió con esfuerzo desarrollar un área importante de la Virología plasmada en esta tesis.

Al Blgo. Juan Sulca Herencia por toda su amistad, consejos, esmero y aporte científico incondicional que inculcó hacia mi persona para poder desarrollar esta tesis y más logros científicos compartidos.

Y a todos los profesores, tesisistas y practicantes del Laboratorio de Virología y otras áreas que colaboraron en el desarrollo de este estudio: Adrián Quintana, Karla Vasquez, Gloria Flores, Bernardo Quispe, Mg. Tito Sánchez, Diego Prada, Abigail Gutierrez

Y a mis amigos colegas de toda una vida que me apoyaron en todo momento: Joe Hermosilla, Junior Caro, Alejandra Fuentes, Oscar Panana y Gustavo Calleja.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Estructura	3
2.2. Serotipos	3
2.3. Genotipos	4
2.4. Manifestaciones clínicas	5
2.5. Ciclo de replicación.....	6
2.6. Patogénesis.....	7
2.7. Epidemiología	10
2.8. Vector	11
2.9. Vigilancia Epidemiológica	13
2.10. Prueba de neutralización por reducción de placas para DENV	15
2.11. Prueba de microneutralización para DENV	17
III. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo General.....	19
3.2. Objetivos específicos	19
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1. Obtención de la semilla viral	20
4.1.1. Producción de <i>stock</i> de semilla viral.....	20

4.1.2. Determinación de la pureza de las semillas virales	20
4.2. Adaptación de la semilla viral a la línea celular Vero-76	23
4.3. Protocolo para la PRNT para DENV-2	23
4.3.1. Prueba de Plaqueo para DENV-2.....	23
4.3.2. PRNT para anticuerpos neutralizantes contra DENV-2	25
4.4. Protocolo para optimizar la MNT para anticuerpos neutralizantes contra DENV-2.	26
4.4.1. Optimización de la prueba de plaqueo para DENV-2 en placas de 96 pozos ..	26
4.4.2. Optimización de la MNT para anticuerpos neutralizantes contra DENV-2	31
V. RESULTADOS	35
5.1. Adaptación del DENV-2 a la línea celular Vero-76 para la optimización de la MNT	35
5.2. Concentración óptima de células Vero-76 para la prueba de microneutralización para DENV-2	36
5.3. Dosis infectiva del 50% en cultivo de células (TCID ₅₀) del <i>stock</i> de semilla viral para la prueba de microneutralización para DENV-2	39
5.4. Determinación del día óptimo de coloración para la prueba de microneutralización para DENV-2	40
5.5. Evaluación de la citotoxicidad del suero en la prueba de microneutralización para DENV-2	40
5.6. Evaluación de la reacción cruzada entre YFV y DENV-2 en la prueba de microneutralización para DENV-2.....	40
5.7. Comparación de los niveles de anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 obtenidos por PRNT y MNT	41
VI. DISCUSIÓN.....	44

VII. FIGURAS.....	51
VIII. CONCLUSIONES	65
IX. RECOMENDACIONES	67
X. ANEXOS.....	68
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ABREVIATURAS

DENV	:	Virus del dengue
DENV-1	:	Virus del dengue serotipo 1
DENV-2	:	Virus del dengue serotipo 2
DENV-3	:	Virus del dengue serotipo 3
DENV-4	:	Virus del dengue serotipo 4
YFV	:	Virus de fiebre amarilla
CHIKV	:	Virus Chikungunya
ZIKV	:	Virus Zika
DCSA	:	Dengue con signos de alarma
DG	:	Dengue grave
DSSA	:	Dengue sin signos de alarma
ADA	:	Amplificación dependiente de anticuerpos
FHD/SCD	:	Fiebre hemorrágica de dengue/síndrome de choque del dengue
PRNT	:	del ingles <i>Plaque reduction neutralization test</i> - “Prueba de neutralización por reducción de placas “
MNT	:	del ingles <i>microneutralization test</i> - “Prueba de microneutralización”
ELISA	:	del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> - “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas”
TCID ₅₀	:	del ingles <i>50% Tissue culture Infective Dose</i> “Dosis infectiva del cultivo celular al 50%”
E-MEM	:	del inglés <i>Earle’s minimum essential medium</i> - “medio mínimo esencial con sales balanceadas de Earle”
WHO	:	del ingles <i>World Health Organization</i> - “ Organización

Mundial de la Salud”

DGE	:	Dirección General de Epidemiología
CDC	:	del inglés <i>Center of disease Control y Prevention</i> “ Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades”
FcR	:	Receptor de la fracción Fc de las inmunoglobulinas
IL-10	:	Interleucina 10
IL-2	:	Interleucina 2
IFN-γ	:	Interferón gamma
TNF	:	Factor de Necrosis Tumoral
UFP	:	Unidades Formadoras de Placas
CMC	:	Carboximetilcelulosa
RT-PCR	:	Siglas en inglés “reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa”
SBF	:	Suero Bovino Fetal
CYD-TDV	:	del inglés “Chimeric Yellow Fever–Dengue virus (DENV) tetravalent dengue vaccine - “Vacuna tetravalente contra el dengue formado por el virus quimérico de fiebre amarilla y dengue ”
ECP	:	Efecto citopático

RESUMEN

El dengue es la arbovirosis de mayor importancia en salud pública a nivel mundial, siendo el serotipo 2 (DENV-2) asociado a grandes brotes en numerosas regiones del Perú diseminadas por *Aedes aegypti*.

El objetivo del estudio fue optimizar la prueba de microneutralización para la detección de anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 en línea celular Vero-76.

Se optimizó la prueba de microneutralización para DENV-2 evaluando distintas concentraciones celulares y porcentajes de suero bovino fetal usado en el medio de mantenimiento. Se realizó 5 pasajes de la semilla viral de DENV-2 confirmado por PCR para la adaptación de la semilla viral a la línea celular Vero-76. Luego, se evaluaron mediante la prueba de microneutralización para DENV-2, 5 sueros seronegativos a DENV-2 y YFV, 5 sueros seronegativos a DENV-2 Y seropositivos a YFV y 5 sueros seropositivos a DENV-2 (confirmados por la prueba de neutralización por reducción de placas para DENV-2 y YFV) en las diluciones 1:5; 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320; 1:640.

Los resultados indican que la concentración óptima de células Vero-76 fue $0,9 \times 10^5$ cel/mL y el porcentaje de Suero Bovino Fetal en el medio de mantenimiento fue de 2% para la prueba de microneutralización. Además, se redujo el uso de la concentración de células Vero-76 en un 64% y el tiempo de desarrollo del ensayo a 5 horas con respecto a la prueba de neutralización por reducción de placas para DENV-2. Así mismo, la mínima dilución capaz de diferenciar un suero seropositivo a DENV-2 de un suero seronegativo a DENV-2 mediante la prueba de microneutralización para DENV-2 fue 1:40 y el tiempo de incubación de la prueba de microneutralización para DENV-2 fue de 10 días.

Se concluye que la prueba de microneutralización para DENV-2 es una prueba con alta sensibilidad y especificidad. Su optimización permitirá realizar estudios de seroprevalencia para dengue lo cual contribuirá a una vigilancia epidemiológica eficiente en el país.

Palabras claves: Virus del dengue, microneutralización, línea celular, optimización, neutralización.

ABSTRACT

Dengue is the most important arbovirolosis in public health worldwide, being the serotype 2 (DENV-2) associated with large outbreaks in regions of Peru disseminated by *Aedes aegypti*.

The objective of the study was to optimize the microneutralization test for the detection of neutralizing antibodies against DENV-2 in the Vero-76 cell line.

The microneutralization test for DENV-2 was optimized evaluating different cell concentrations and percentages of fetal bovine serum used in the maintenance medium. In addition, 5 passages of the DENV-2 viral seed confirmed by PCR were performed for the adaptation of the viral seed to the Vero-76 cell line. Subsequently, 5 sera seronegative to DENV-2 and YFV, 5 seronegative to DENV-2 and sera seropositive to YFV and 5 sera seropositive to DENV-2 (confirmed by plaque reduction neutralization test for DENV-2 and YFV) at final dilutions of 1: 5; 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1: 160; 1: 320 and 1: 640.

The results indicate that the optimum concentration of Vero-76 cells was 0.9×10^5 cells/mL and the percentage of fetal bovine serum in the maintenance medium was 2% for the microneutralization test. In addition, the concentration of Vero-76 cells was reduced by 64% and the time of test development was reduced to 5 hours with respect to plaque reduction neutralization test for DENV-2. In addition, the minimum dilution capable to discriminate seropositive serum to DENV-2 from seronegative serum to DENV-2 by microneutralization test. was 1:40 and the incubation time of microneutralization test for DENV-2 was 10 days.

As a conclusion, the microneutralization test for DENV-2 is a test with high sensitivity and specificity. Its optimization will allow performing seroprevalence studies for dengue, which will contribute to an effective epidemiological surveillance in this country.

Key words: Dengue virus, microneutralization, cell line, optimization, neutralization.

I. INTRODUCCIÓN

El dengue es la arbovirosis más importantes, que causa mayor morbilidad y mortalidad en áreas tropicales y subtropicales (Choque *et al.*, 2016). Anualmente se producen 390 millones de infecciones y más de un tercio de la población mundial está en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 2017). En el Perú, 18 de 24 departamentos presentan hiperendemicidad a dengue principalmente por el DENV-2 - genotipo americano/Asiático Linaje I y Linaje II, el cual está asociado a grandes brotes de dengue clásico y dengue hemorrágico en regiones diseminadas por *Aedes aegypti* (DGE; 2017).

La vigilancia epidemiológica de dengue se realiza mediante pruebas de laboratorio basados en pruebas moleculares y pruebas serológicas, siendo las pruebas de ELISA IgM e IgG las más usadas, porque permite un diagnóstico rápido de la enfermedad y útil para estudios de prevalencia (Cabezas *et al.*, 2015); sin embargo, la prueba de ELISA IgG presenta baja especificidad debido a las reacciones cruzadas en los determinantes antigénicos compartidos entre los cuatro serotipos del DENV y miembros de la familia Flaviviridae (Rockstroh *et al.*, 2015). La PRNT es una prueba altamente sensible y específica que permite discriminar los cuatro serotipos de DENV y brindar resultados confirmatorios (Timiryasova *et al.*, 2013); sin embargo, dentro de sus desventajas, la PRNT emplea mucho volumen de muestra (Vaidya *et al.*, 2010), además es laboriosa y costosa, haciendo difícil su utilización en la vigilancia serológica a gran escala (Roehrig *et al.*, 2008) por esta razón es necesario desarrollar prueba en micrométodos con elevada sensibilidad y especificidad que permitan procesar un mayor número de muestras séricas como las pruebas de microneutralización (CDC, 2016), siendo ideales para confirmar los resultados positivos diagnosticados por la prueba de ELISA IgG (Barreto, 2008; Huaman, 2008; Juarez, 2009). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es optimizar la prueba de microneutralización para anticuerpos neutralizantes contra DENV-2, lo cual contribuirá

a una vigilancia epidemiológica eficaz mejorando en la prevención y control de esta enfermedad en el Perú (DGE, 2015).

II. MARCO TEÓRICO

El virus del dengue es el agente que causa la fiebre del dengue, perteneciente al grupo de riesgo II y es transmitido generalmente por el mosquito de la especie *Aedes aegypti* y en menor grado, por *Aedes albopictus*. (WHO, 2017)

2.1. Estructura

El DENV pertenece a la familia Flaviviridae, género Flavivirus. Su material genético del DENV se constituye por un ARN genómico de sentido positivo de 11 kb de longitud (Junjhon *et al.*, 2014), envuelto por una nucleocápside de simetría icosaédrica de 30 nm de diámetro, la cual está constituida por una proteína C (cápside) de 11 kd y rodeada por una bicapa lipídica de 10 nm de grosor que a su vez se insertan las proteínas estructurales E que conforma la envoltura y M que forma la membrana del virus (Arias, 2011). El interior del virus contiene el complejo riboproteico constituido por la proteína de la cápside y el genoma que codifica para un polipeptido único, que es posteriormente procesada por enzimas tanto del virus como del hospedador, dando lugar a tres proteínas estructurales (prM/M, E y C) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) que participan durante los procesos de ensamblaje y replicación del ARN genómico (Velandia *et al.*, 2011).

2.2. Serotipos

El DENV es un grupo de cuatro virus estrechamente relacionados, pero antigénicamente distintos y denotados como serotipos: DENV-1, DENV- 2, DENV-3 y DENV-4 (WHO, 2017). Los 4 serotipos son genéticamente similares y comparten alrededor de 65% a 70% de similitud en la secuencia de nucleótidos (El-Kafrawy *et al.*, 2016).

Según Taylor, 2016, menciona la probable existencia de un serotipo adicional (DENV-5), este probable nuevo serotipo fue descubierto en un análisis de muestras de un brote de dengue en Malasia en el 2006. Al inicio se pensó que era un caso de dengue producido por DENV-4; sin embargo, se realizaron estudios de secuenciación genómica y se encontró que era filogenéticamente distinto. A su vez, se realizaron estudios de inmunización con monos macacos Rhesus con el probable nuevo serotipo y este produjo anticuerpos distintos a los otros serotipos, las cuales el título de anticuerpo fue 4 veces mayor a comparación de los otros serotipos (Mustafa *et al.*, 2015). Actualmente, se están haciendo más investigaciones para saber si es un nuevo serotipo o una variante de alguno de los 4 serotipos ya existentes, por lo que la OMS aún no considera este nuevo serotipo en la clasificación de los serotipos de DENV.

Casi todas las áreas del Perú con presencia de *Aedes aegypti* muestran casos de dengue con la circulación de los cuatro serotipos de dengue (Cabezas *et al.*, 2015) siendo el DENV-2 - genotipo americano/asiático Linaje I y Linaje II el serotipo que circula en la mayoría de los departamentos del Perú con mayor predominancia hasta la semana epidemiológica N° 21-2017 (DGE, 2017).

2.3. Genotipos

Los serotipos de DENV están clasificados en varios genotipos, tal es así que el DENV-1 está dividido en 5 genotipos: I, II, III, IV y V (Bona *et al.*, 2012), el DENV-2 está dividido en 6 genotipos tales como el asiático/ americano, asiático I, asiático II, cosmopolita, americano, y selvático (Waman *et al.*, 2016). El DENV-3 se clasifica en 4 genotipos: I, II, III y IV (Waman *et al.*, 2017) y el DENV-4 se clasifica en 4 serotipos: I, II, III y selvático En el 2013, Mamani reportó los genotipos y linajes de serotipos de DENV que circularon durante los años 1998 y 2012 en el Perú, tal es así que el DENV-1 presentó el genotipo V con tres linajes; el DENV-2 presentó dos genotipos: el genotipo americano con dos

linajes y el genotipo americano/asiático con cinco linajes, el DENV-3 presentó el genotipo III con cinco linajes y finalmente el serotipo DENV-4 presenta dos linajes.

2.4. Manifestaciones clínicas

La infección por DENV puede cursar de forma asintomática o manifestarse con un amplio espectro clínico que va desde las formas inaparentes o febriles con dolores de cuerpo a formas graves que incluyen al choque y alteración de la hemostasia con hemorragia o sin ella.

Antes del 2009, la clasificación para el dengue se dividía en dengue clásico, dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue, esta clasificación no era muy adecuada para brindar el tratamiento clínico para dengue y discriminar los casos de dengue (Pizarro, 2009). En el 2009, la WHO recomendó una nueva clasificación de la enfermedad debido a los inconvenientes percibidos con la clasificación anterior, tenemos así: dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave. Esta nueva clasificación mejora el manejo de las formas no graves en los establecimientos de primer nivel de atención y la atención especializada de las formas graves en los establecimientos del segundo y tercer nivel de atención como se define a continuación.

Dengue sin signos de alarma: Persona que vive o ha viajado en los últimos 14 días a zonas con transmisión de dengue y presenta fiebre habitualmente de 2 a 7 días de evolución y 2 o más de las siguientes manifestaciones: Nausea/vómitos, Exantema, cefalea/dolor retroorbitario, mialgia/artralgia, Petequias o prueba del torniquete (+), leucopenia. También puede considerarse como DSSA a todo niño proveniente o residente en zona con transmisión de dengue, con cuadro febril agudo, usualmente entre 2 a 7 días y sin foco aparente.

Dengue con signos de alarma: Todo caso de dengue que cerca de y preferentemente a la caída de la fiebre presenta uno o más de los siguientes signos tales como: dolor abdominal intenso o dolor a la palpación del abdomen, vómitos persistentes, acumulación de líquidos (ascitis, derrame pleural, derrame pericardiaco), sangrado de mucosas, letargo/ irritabilidad, hipotensión postural (lipotimia), hepatomegalia > 2 cm, aumento progresivo del hematocrito.

Dengue grave: Todo caso de dengue que tiene una o más de las siguientes manifestaciones: choque o dificultad respiratoria debido a extravasación grave de plasma, choque evidenciado por: pulso débil o indetectable, taquicardia, extremidades frías y llenado capilar mayor a 2 segundos, presión de pulso menor igual a 20 mmHg: hipotensión en fase tardía, sangrado grave: según la evaluación del médico tratante (ejemplo: hematemesis, melena, metrorragia voluminosa, sangrado del Sistema Nervioso central (SNC). compromiso grave de órganos: como daño hepático (AST o ALT \geq 1000 UI), SNC (alteración de conciencia), corazón (miocarditis) u otros órganos.

2.5. Ciclo de replicación

La infección del DENV inicia con la interacción de las células humanas, entre ellas, monocitos, macrófagos, células dendríticas de la piel y linfocitos CD4+ y CD8+ (Velandia *et al.*, 2011), mediante la presencia de receptores de superficie celular, siendo la glicoproteína E la proteína responsable de la unión mediante su dominio III localizado en su extremo carboxiterminal. Diversos estudios indican que el glicosaminoglicano heparan sulfato y las lectinas está involucrados en la unión del DENV con células de mamíferos, pero la internalización del virión también puede ocurrir por la formación de complejos IgG, las cuales se unen a las células susceptibles por sus receptores. Seguidamente las células ingresan por endocitosis y la acidificación de las vesículas endosomal desencadenan cambios conformacionales en la glicoproteína E, las cuales se produce

una trimerización irreversible, permitiendo la liberación de la nucleocápside en el citoplasma y la liberación del RNA viral, dando inicio a los procesos de traducción y replicación (Screaton *et al.*, 2015).

Una vez liberado el material genético, se utiliza directamente como RNA mensajero, el cual posee un único marco de lectura abierto (ORF) que es traducido en el retículo endoplasmático rugoso dando una poliproteína. El proceso proteolítico ocurre co-traducciona l y post-traducciona l por proteasas tanto celulares como virales (NS2B-NS3) dando lugar a 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales (C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) (Fajardo, 2011).

Una vez sintetizadas las proteínas esenciales para la replicación, las proteínas NS3 y NS5 forman el complejo de replicasa viral y replica el ARN viral produciendo una molécula complementaria de ARN de polaridad negativa, la que a su vez actúa como soporte para la síntesis de nuevas cadenas de ARN de polaridad positiva (Arias, 2011).

Para el ensamblaje y salida del virus, inicialmente se forma la nucleocápside por la interacción del ARN viral y la proteína C en presencia de gotas de lípidos, luego se forman unas partículas virales inmaduras no infecciosas a nivel del retículo endoplasmático, formada por las proteínas E, prM. La ruptura proteolítica de prM ocurre en el aparato de Golgi, madurando de esta forma la partícula viral y haciéndola infecciosa. Este virus completo es liberado de la célula por exocitosis para así infectar nuevas células (Velandia *et al.*, 2011).

2.6. Patogénesis

La patogénesis de las infecciones por DENV se ha tratado de explicar mediante hipótesis, la hipótesis más cercana es la amplificación dependiente de anticuerpos en el desarrollo de FHD/SCD, en pacientes que presentan una infección secundaria por un serotipo

heterólogo (Huang *et al.*, 2016). Este proceso sucede cuando las células B generadas contra la infección primaria responden rápidamente, produciendo altos títulos de anticuerpos no neutralizantes que potenciarán la infección actual en lugar de neutralizar el virus. Los anticuerpos no neutralizantes heterólogos son capaces de reconocer epítomos de DENV y aumentar la infectividad de una manera dependiente de Fc. Brevemente, la ADA potencia la infección mediante la unión del virus potencialmente infeccioso a sus células diana, esencialmente en monocitos y macrófagos. Estas células expresan receptores para la porción Fc de anticuerpos, en este caso la FcR, que se une a las IgG. Los complejos de virus / anticuerpos no neutralizantes se capturan a través de FcR y se internaliza. Dado que la incorporación de los complejos virus-anticuerpo es más eficaz que la entrada del virus libre a través del receptor de la célula huésped (Guabiraba *et al.*, 2014).

Es interesante que, los estudios *in vitro* revelan que la infección de monocitos humanos y células dendríticas maduras brinda como resultado un aumento de la replicación del virus como resultado de la supresión del sistema de interferón. Los genes asociados al interferón tipo I se activan en menos cantidad en las células mononucleares de sangre periférica tomadas de pacientes con enfermedad grave del dengue en comparación con la enfermedad más leve. Posteriormente, el aumento del número de células infectadas presenta dianas para las células CD4⁺ y CD8⁺, brindando grandes cantidades de IL-10, IL-2, IFN- γ y TNF para el daño endotelial y alteración de la hemostasia. Los viriones liberados de las células infectadas también podrían dañar directamente las células endoteliales y la absorción de la proteína no estructural NS1 por los hepatocitos, las cuales podría promover la infección viral del hígado (Guzman *et al.*, 2010). El dengue con mayor severidad ha sido asociado con la infección secundaria DENV-1/DENV-2 en Cuba, y en Iquitos se reportó una epidemia en 1900 por DENV-1. Posteriormente en 1995, se

detectaron infecciones con el genotipo americano DENV-2 y muchas personas infectadas con DENV-2 tenían anticuerpos provocada por una infección anterior con DENV-1; sin embargo, no se desarrolló ninguna manifestación clínica tal como pasó en Cuba, esto se debe a las reacciones cruzadas en los determinantes antigénicos compartidos entre los cuatro serotipos del DENV y miembros de la familia Flaviviridae (Rockstroh *et al.*, 2015). En otro caso, los anticuerpos contra DENV-1 de sueros de residentes de Iquitos neutralizaron fuertemente al DENV-2 genotipo americano; sin embargo, no neutralizaron al DENV-2 genotipo americano/asiático reflejando una neutralización heterotípica por anticuerpos a DENV-1 y un desencadenamiento de infecciones severas y expresiones clínicas (Williams *et al.*, 2014)

Alternativamente, se ha sugerido que algunas cepas con un determinado potencial de virulencia pueden incrementar su tasa de replicación en determinadas células humanas, y que algunos genotipos virales están asociados a la ocurrencia de FHD, lo cual indicaría que las cepas quizás presenten alguna característica asociada con incremento en el riesgo de presentación de casos severos, que determinan por sí mismas la gravedad de la enfermedad de modo que DENV-2 parece ser más peligroso que los demás serotipos (Camacho *et al.*, 2009).

Las manifestaciones clínicas estarían relacionadas de acuerdo a la cepa, serotipo, genotipo y linajes de DENV por ser más o menos virulentas, siendo las cepas del DENV-2 del sudeste Asiático las que tienen más posibilidades de causar la fiebre del dengue hemorrágico y el síndrome de shock por dengue (Duran *et al.*, 2010), así como el DENV-2 genotipo americano/asiático linaje II que está relacionado a los casos de dengue severo ocurrido en el 2010, en Iquitos, Perú (Williams *et al.*, 2014) y el DENV-2 genotipo americano relacionado a los casos de dengue benigno (Martina *et al.*, 2009).

2.7. Epidemiología

La presencia de los 4 serotipos de DENV comienza desde la reemergencia del dengue en el Perú en el siglo XX con la reintroducción del *Aedes aegypti* en 1984 (luego de su erradicación en 1956), no obstante, en 1990 el DENV-1 se introdujo por la ciudad de Iquitos causando una gran epidemia, en 1995 se introdujo el genotipo americano del DENV-2 y posteriormente, durante la epidemia de dengue en la costa norte del país en el 2000, fue determinado un linaje del genotipo americano/ asiático. El DENV-3 fue registrado a partir del 2001, el DENV-4 a partir del 2008 (Cabezas *et al.*, 2015). Durante 2010 y 2011, la región de Loreto, Perú, experimentó un brote de dengue severo asociado al DENV-2 genotipo americano/asiático linaje II. Esta detección es notable porque el DENV-2 no ha sido detectado en la región de Loreto después de casi 8 años. (Willians *et al.*, 2014) y durante los años 2014 y 2016, 18 de 24 departamentos del Perú han presentado hiperendemicidad a dengue por DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4; existiendo un predominio del DENV-2 (DGE; 2016).

Los casos graves de dengue están relacionados con los factores de riesgo tales como la edad, sexo, raza y comorbilidades. Con respecto a la edad, los individuos menores de 12 años tienen mayor predisposición a la fiebre del dengue hemorrágico y el síndrome de shock por dengue. Con respecto al sexo, las mujeres se enferman con más frecuencia que los varones. Con respecto a la raza, los sujetos de raza caucásica se ven afectados más a menudo que los de raza negra (Duran *et al.*, 2010) y con respecto a la comorbilidad las enfermedades tales como la diabetes, hipertensión, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal, enfermedades autoinmunes y enfermedades hemolíticas crónicas pueden empeorar los casos de dengue en la persona.

2.8. Vector

Aedes aegypti es el principal vector que transmite el DENV, así mismo transmite el YFV, CHIKV y ZIKV (Ruiz *et al.*, 2016). La distribución geográfica de *Aedes aegypti* abarca una extensa franja tropical y subtropical, entre Estados Unidos, toda América y Argentina. Se encuentra en cerca de 100 países tropicales, y cubre la mayor parte de África, Medio Oriente, Sudeste asiático, norte de Australia, e incluso algunas zonas de Europa (Acosta *et al.*, 2005). *Aedes albopictus* es considerado como principal vector en lugares donde *Aedes aegypti* está ausente, este vector posee una mayor termotolerancia a descensos de la temperatura ambiental.

Aedes aegypti se alimenta casi exclusivamente de los humanos en las horas del día y normalmente descansa en el interior de los hogares. En cambio, *Aedes albopictus* es generalmente exofágico y pica a humanos y animales oportunista pero también se ha demostrado que presentan un comportamiento fuertemente antropofílico similar a *Aedes aegypti* (Kraemer *et al.*, 2015).

La transmisión del DENV al humano inicia con la picadura del vector en la piel del humano, durante el proceso de alimentación hematófaga del mosquito hembra. Después de la infección del humano, el virus se encuentra en un periodo de incubación, durante el cual circula en la sangre periférica e infecta diversas células. Posteriormente, si un nuevo mosquito pica a la persona enferma durante el estado de viremia, este puede infectarse y subsecuentemente transmitir el virus a otra persona, manteniendo el ciclo de transmisión. Los primates actúan como reservorios del DENV en el Este de África y Sudeste asiático manteniendo el ciclo de transmisión (Bean *et al.*, 2013), siendo el macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) la especie empleada para estudios de viremia para DENV (Althouse *et al.*, 2014).

En el Perú, *Aedes aegypti* está distribuido en 20 regiones (Lima, Piura, La Libertad, Callao, Loreto, San Martín, Lambayeque; Ica, Ancash, Junín; Ucayali, Huanuco, Cajamarca, Tumbes, Amazonas, Cusco, Madre de Dios, Pasco, Ayacucho, Puno) comprometiendo a 385 distritos infestados y a 18 434 597 personas que están en riesgo de adquirir la enfermedad (DGE, 2016). Cabe mencionar que, en el 2015, se han encontrado la presencia de *Aedes aegypti* en nuevas localidades en la cual no se conocía su presencia y que podrían ocurrir la aparición de casos de dengue, tal como ha sucedido en el distrito de Ayna, Ayacucho, en el distrito de Churubamba, Huanuco y en el distrito de Parcona, Ica. Con respecto a la región de Ica, una probable vía de dispersión hacia la región Ica puede haber sido a través de Lima (vía carretera Panamericana), pero también a través de la carretera Libertadores Wari desde el valle de los ríos Apurímac, Ene y Mantaro (VRAEM), por lo que las ciudades que están a lo largo de esta vía también pueden estar infestadas. Asimismo, la presencia de *Aedes aegypti* a 1900 m de altitud en la ciudad de Huánuco, representa la de mayor altitud reportada en el Perú (Requena *et al.*, 2016).

Es muy difícil de controlar o eliminar el *Aedes aegypti* por las condiciones ecológicas más propicias para el desarrollo del mosquito, por la sobrevivencia de los huevos a largos periodos de desecación, por las condiciones socioeconómicas, el crecimiento poblacional sostenido, viviendas inapropiadas en centros urbanos, inadecuada disposición de residuos, uso cada vez mayor de envases no biodegradables en el medio así como neumáticos en desuso, el inadecuado saneamiento ambiental, la resistencia a insecticidas (Cabezas *et al.*, 2015); por tal razón, los índices aélicos son altos en algunas localidades y distritos, desde los últimos meses del año 2015 hasta febrero del 2016, especialmente en los departamentos de Piura, Tumbes, Loreto, Ucayali, San Martín y Madre de Dios, lo

que constituye un factor de riesgo importante para la persistencia o incremento de casos y presencia de brotes de gran magnitud y severidad.

En un estudio de transmisión vertical del DENV, se logró determinar la presencia de RNA del DENV-2 en mosquitos adultos hembras, en 6 de las 10 localidades estudiadas. Este estudio ha permitido determinar la presencia de DENV-2 a partir de mosquitos *Aedes aegypti* criados en laboratorio, lo cual indicaría la ocurrencia de transmisión transovárica en este vector lo que podría explicarse la persistencia de casos de dengue en las áreas estudiadas (Cabezas *et al.*, 2015).

2.9. Vigilancia Epidemiológica

La vigilancia epidemiológica, constituye un instrumento de vital importancia para identificar, medir y analizar los problemas de salud que afectan a la población y, sobre esta base, tomar decisiones orientadas a promocionar la salud, prevenir la enfermedad o, en su defecto, controlar los problemas que ya se hayan presentado (Pujol *et al.*, 2013).

La Vigilancia en Salud Pública del Dengue en el Perú, se sustenta dentro del enfoque de riesgo de los macro y microfactores que interaccionan entre el huésped, vector y el virus dengue, la cual permitirá identificar escenarios epidemiológicos para valorar y estratificar al país; que oriente la toma de decisiones y disminuya el costo de las intervenciones a través de la vigilancia epidemiológica de casos, vigilancia virológica y serológica y vigilancia entomológica (DGE, 2015).

En el Perú, la vigilancia virológica y serológica de dengue se realiza mediante las pruebas de laboratorio que se basan en la detección del material genético del DENV, en la detección de la proteína NS1 del DENV y en las pruebas serológicas tales como Inhibición de la hemaglutinación, fijación del complemento, PRNT y ELISA. Las pruebas de diagnóstico deben aplicarse según el tiempo de enfermedad, así el aislamiento viral, la

detección del material genético y la detección de la proteína NS1 pueden hacerse en los primeros cinco días, y a partir del quinto día en promedio el uso de pruebas para la detección de anticuerpos IgM tales como ELISA, inhibición de hemaglutinación. Posteriormente los anticuerpos IgG se producen entre 2 y 4 semanas después de la aparición de la infección primaria y casi inmediatamente después de la aparición de una infección secundaria, para ello se usan las pruebas de ELISA Y PRNT para su diagnóstico (Cabezas *et al.*, 2015).

Las pruebas de ELISA IgM e IgG son las más usadas porque permite un diagnóstico rápido de la enfermedad y útil para estudios de prevalencia (Cabezas *et al.*, 2015); sin embargo, la prueba de ELISA IgG presenta baja especificidad debido a las reacciones cruzadas en los determinantes antigénicos compartidos entre los cuatro serotipos del DENV y miembros de la familia Flaviviridae (Rockstroh *et al.*, 2015), por ello es necesario corroborar los resultados con una prueba confirmatoria para evitar reportar falsos positivos y la sobreestimación de número de casos en estudios de prevalencia.

Existe en la vigilancia epidemiológica una creciente necesidad en el control eficaz contra el dengue. Actualmente, no existe tratamiento para el dengue; sin embargo, en el 2014, la farmacéutica Sanofi Pasteur puso en comercio la vacuna contra el dengue llamado Dengvaxia (CYD-TDV) la única vacuna autorizada para su comercialización según la OMS. Dengvaxia es una vacuna quimérica que contiene los 4 serotipos de DENV recombinantes atenuados vivo. Cada recombinante quimérico monovalente se toma por separado reemplazando los genes que codifican las proteínas prM y E del genoma del YFV-17 D atenuado con los correspondientes genes de las cepas nativas de los 4 serotipos de DENV. La formulación final contiene 4,5-6,0 log₁₀ de TCID₅₀ de los 4 serotipos atenuados de DENV (OMS, 2016). La vacuna induce una mejor respuesta inmune humoral contra la infección de DENV comparado con una infección normal

(Agarwal *et al.*, 2017). La eficacia de la vacuna contra el dengue es mejor en individuos seropositivos a DENV (por exposición anterior a DENV) que en individuos seronegativos a DENV, según estudios, la eficacia de la vacuna contra el dengue confirmado por aislamiento del virus en los individuos seropositivos para la exposición anterior al virus fue del 78,2%, mientras que en los inicialmente seronegativos fue del 38,1% (no estadísticamente significativo; por otro lado, estudios aun no pueden demostrar la eficacia de la vacuna a la largo plazo (OMS, 2016). La OMS recomienda que los países consideren la posibilidad de introducir la vacuna CYD-TDV contra el dengue solo en entornos geográficos en los que los datos epidemiológicos indiquen que hay una gran carga de enfermedad. Por el momento, la vacuna ya ha sido aprobada para su uso en México, Filipinas, Brasil, El Salvador, Costa Rica, Paraguay, Guatemala, Perú, Indonesia, Tailandia y Singapur, por lo que en los próximos años se estima que bajaría la incidencia de casos de dengue en el Perú.

2.10. Prueba de neutralización por reducción de placas para DENV

La PRNT para DENV es una prueba serológica cuantitativa muy específica y muy sensible entre los flavivirus y los serotipos de DENV (Alvarez *et al.*, 2010). La PRNT es desarrollada en placas de 6,12 y/o 24 pozos y las líneas celulares que se emplea para los ensayos son Vero, BHK-21 o LLMCK, sin embargo, la línea celular Vero es la línea recomendada por la OMS para el diagnóstico de DENV (Roehrig *et al.*, 2008). Para desarrollar la PRNT es necesario obtener el título viral, este se obtiene mediante el conteo de las placas de lisis originadas por cada virus infeccioso las cuales se denomina "Unidades Formadoras de Placa" (UFP) y el título viral es expresado como "UFP/mL" o "UFP/g". Las placas virales se observan macroscópicamente después de la coloración de los pozos y es importante el tiempo de incubación de la prueba además del medio de recubrimiento que permite definir las placas las cuales puede ser de agarosa,

carboximetilcelulosa (Baer *et al.*, 2014). El colorante que se emplea es azul negro de Naftol y su coloración permite observar el contraste entre la monocapa celular coloreada y la placa viral no coloreada (Roehrig *et al.*, 2008). El tiempo de incubación de la PRNT postinoculación por el método semisólido usando células Vero en suspensión varía de acuerdo a cada serotipo de DENV. Según Alvarez *et al.*, 2010, el tiempo de incubación para DENV-1 es 11 días aproximadamente, para DENV-2 es entre 7 a 8 días con un tamaño de placas de 2 mm de diámetro aproximadamente, para DENV-3 es 10 días aproximadamente y para DENV-4 es entre 8 a 10 días.

El criterio para expresar los resultados de los sueros se establece mediante la reducción del porcentaje de placas usando el punto de corte al 50% (PRNT₅₀). Los sueros positivos deben neutralizar al virus y la última dilución del suero debe mostrar 50% de reducción de placas a más (Thomas *et al.*, 2009; Roehrig *et al.*, 2008). Existen criterios especiales para expresar resultados de los sueros usando puntos de corte mayor al 50%. Al analizar sueros procedentes de una zona endémica se usa el punto de corte al 70% (PRNT₇₀) para reducir potencialmente las reacciones cruzadas entre flavivirus y serotipos de DENV. Al analizar sueros para determinar anticuerpos neutralizantes frente a un virus nuevo de una región o realizar evaluaciones adicionales con condiciones aún más estrictas se debe usar como punto de corte al 90% (PRNT₉₀) (Forshey *et al.*, 2016). Otro punto importante es la expresión de resultados de la PRNT cuando se realizan estudios epidemiológicos en zonas endémicas para DENV, debido a que el punto de corte debe aumentar para evitar reacción cruzadas entre flavivirus (Roehrig *et al.*, 2008). Los estudios relacionados al PRNT mencionan las ventajas de la prueba relacionado al desarrollo de vacunas contra DENV y estudios epidemiológico (Salje *et al.*, 2014), además por ser una prueba cuantitativa, muy sensible y específica, permite discriminar los cuatro serotipos de DENV y brindar resultados confirmatorios (Timiryasova *et al.*, 2013); sin embargo, dentro de sus

desventajas, la PRNT emplea mucho volumen de muestra (Vaidya *et al.*, 2010), es laboriosa, demanda mucho tiempo por el largo proceso que involucra, es costosa y para su realización se necesita de personal altamente capacitado, haciendo difícil su utilización en la vigilancia serológica a gran escala (Roehrig *et al.*, 2008).

2.11. Prueba de microneutralización para DENV

La prueba de microneutralización para DENV es desarrollada en placas de 96 pozos y es una prueba semicuantitativa con elevada sensibilidad y especificidad que permite discriminar las muestras positivas de las muestras negativas a la presencia de anticuerpos neutralizantes, por lo cual es ideal para confirmar los resultados positivos diagnosticados por la prueba de ELISA IgG (Barreto, 2008; Huaman, 2008; Juarez, 2009).

El título viral se halla obteniendo el TCID₅₀ definido como la dilución de virus capaz de infectar al 50% de los cultivos celulares y esto se calcula inmediatamente de la lectura de la placa cuando el valor corresponde exactamente a un 50% de los pocillos infectados, caso contrario, se utiliza el Método de Reed y Muench que calcula la distancia proporcional exacta entre dos diluciones para encontrar el punto final del 50% (Juarez, 2009; Huaman, 2008). La calidad de la monocapa formada se visualiza por la presencia o ausencia de la monocapa celular en los pozos revelados con azul negro de naftol. El día óptimo de coloración es un factor muy importante para visualizar la calidad de la monocapa formada obtenida a partir de la neutralización o no neutralización de los sueros. La prueba de microneutralización mejora el rendimiento de la prueba procesando un mayor número de muestras séricas en un menor tiempo por ensayo con ahorro de materiales y medios (CDC, 2016).

Actualmente en el Perú existen escasos estudios que hayan desarrollado la prueba de microneutralización para anticuerpos neutralizantes contra una cepa nativa de DENV-2,

como prueba confirmatoria. Por lo tanto, el presente estudio tiene como finalidad optimizar la prueba de microneutralización para anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 empleando la línea celular Vero-76. Este estudio ayudará a desarrollar una eficaz vigilancia epidemiológica para dengue, muy importante para la toma de decisiones en la prevención y control de esta enfermedad (DGE, 2015).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Optimizar la prueba de microneutralización para detectar anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 en línea celular Vero-76.

3.2. Objetivos específicos

- Adaptar la semilla viral a la línea celular Vero-76 para la prueba de microneutralización para DENV-2.
- Determinar la concentración óptima de células Vero-76 para la prueba de microneutralización para DENV-2.
- Determinar la Dosis infectiva del 50% en cultivo de células (TCID₅₀) del *stock* de semilla viral para la prueba de microneutralización para DENV-2.
- Determinar el día óptimo de coloración para la prueba de microneutralización para DENV-2.
- Evaluar la reacción cruzada entre YFV y DENV-2 en la prueba de microneutralización para DENV-2.
- Evaluar la toxicidad del suero en la prueba de microneutralización para DENV-2
- Comparar los niveles de anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 obtenidos por la prueba de neutralización por reducción de placas y la prueba de microneutralización.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La semilla viral de DENV-2 fue aislado a partir de una muestra de suero en fase aguda mediante el método de aislamiento viral y fue identificado por PCR. Luego, se evaluaron 10 muestras de sueros de la ciudad de Madre de Dios, que fueron obtenidos en el 2014 y 10 muestras de suero de la ciudad de Lima, que fueron obtenidos en el 2016. Estos sueros fueron evaluados mediante la PRNT para DENV-2 y PRNT para YFV y se obtuvieron 5 sueros control seropositivos a DENV-2, 5 sueros control seronegativos a DENV-2 y seropositivos a YFV y 5 sueros control seronegativos a DENV-2 y YFV. Posteriormente, los 15 sueros fueron evaluados mediante la MNT para DENV-2 (ver Anexo 4).

4.1. Obtención de la semilla viral

4.1.1. Producción de *stock* de semilla viral

A partir de un aislamiento viral realizado en placas de 24 pozos y caracterizado por ligero efecto citopático a los 11 días, se procedió a propagar el virus inoculando 200 μ L del virus en un frasco de 25 cm² con monocapa confluyente de células Vero-76.

Para la absorción viral, se incubó por 60 minutos a 37 °C. Luego de este periodo se adicionó 8 mL del medio de mantenimiento al 2% de SBF y se dejó incubando hasta observar un efecto citopático de 75% de desprendimiento celular aproximadamente. Finalmente se centrifugó la suspensión viral a 2000 rpm por 10 minutos, se colectó el sobrenadante y se alicuotó en crioviales para ser guardados a - 80 °C hasta su uso.

4.1.2. Determinación de la pureza de las semillas virales

Se procedió a realizar la extracción del RNA usando el Kit de extracción QIAmp viral RNA (Qiagen), siguiendo las indicaciones del Kit; se preparó 560 μ L de buffer AVL y 140 μ L de

la semilla viral en un tubo de centrifuga de 1,5 mL y se mezcló por 15 segundos en el vórtex, se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 minutos, se adicionó 560 µL de etanol de 96° a la muestra y se homogenizó por 15 segundos, luego se agregó 630 µL de la solución a la columna QIAamp, con un tubo colector de 2 mL. Se tapó y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. Luego se colocó la columna de QIAamp en un tubo de colección nuevo y se descartó el primer tubo que contenía el filtrado, luego se destapó cuidadosamente la columna QIAamp y se volvió a cargar 630 µL de la solución a la columna QIAamp, con un tubo colector de 2 mL. Se tapó y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. Luego se colocó la columna de QIAamp en un tubo de colección nuevo y se descartó el primer tubo que contenía el filtrado, luego se destapó la columna QIAamp y se adicionó 500 µL de buffer AW1, se tapó y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto, luego se colocó la columna de QIAamp en un tubo de colección nuevo y se descartó el tubo que contenía el filtrado, se descartó la columna QIAamp y se adicionó 500 µL de buffer AW2. Se tapó y se centrifugó a 14000 rpm por 3 minutos. Luego se colocó la columna de QIAamp en un tubo de colección nuevo y se descartó el primer tubo que contenía el filtrado. Cuidadosamente se destapó el tubo de la columna QIAamp y se adicionó 40 µL de buffer AVE, luego se incubó el tubo por 1 minuto a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto, se recuperó el eluida y se almacenó a -80°C.

Para la prueba de PCR en tiempo real, se empleó el termociclador Rotor-Gene Q de la marca QIAGEN. Se realizó un ensayo basado en sondas de hidrólisis, para la detección simultánea de los cuatro serotipos de DENV. Para esto se emplearon los siguientes primers y sondas.

TABLA 1: Características del primer, secuencia y canal de cada serotipo de DENV para el RT-PCR en tiempo real.

Serotipo	Primer	Secuencia	Canal en Rotor-Gene Q
DENV-1	DEN-1 F	5-CAAAAGGAAGTCGTGCAATA-3	Verde
	DEN-1 C	5'-CTGAGTGAATTCTCTCTACTGAACC-3'	
	DEN-1 FAM	5'-CATGTGGTTGGGAGCACGC-3'	
DENV-2	DEN-2 F	5'-CAGGTTATGGCACTGTCACGAT-3'	Amarillo
	DEN-2 C	5'-CCATCTGCAGCAACACCATCTC-3'	
	DEN-2 HEX	5'-CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA-3'	
DENV-3	DEN-3 F	5'-GGACTGGACACACGCACTCA-3'	Anaranjado
	DEN-3 C	5'-CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT-3'	
	DEN-3 TxRed	5'-ACCTGGATGTGCGCTGAAGGAGCTTG-3'	
DENV-4	DEN-4 F	5'-TTGTCCTAATGATGCTGGTGC-3'	Rojo
	DEN-4 C	5'-TCCACCTGAGACTCCTTCCA-3'	
	DEN-4 Cy5	5'-TTCCTACTCCTACGCATCGCATTCCG-3'	

La preparación de la mezcla de reacción para la RT-PCR en tiempo real fue como sigue:

En un microtubo de 0.2 mL se mezcló lo siguiente: 12.5 µL de Buffer 2x RG, 2.3 µL de agua libre de RNAsas, 0.5 µL de cada primer (0,4 µM), 0.25 µL de cada sonda (0.1 mM) y 0.20 µL de enzima (RG RT MIX). Se dispensó 5 µL del eluido de extracción de la muestra. Las condiciones de la RT-PCR en tiempo real fueron las siguientes:

TABLA 2: Condiciones de la RT-PCR en tiempo real

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Retrotranscripción	50°C	15 min	1 Ciclos
Activación de la enzima	95°C	5 min	1 Ciclos
Desnaturalización	95°C	15 s	45 Ciclos
Extensión	60°C	15 s	

Luego de realizar la RT-PCR en tiempo real se obtuvieron las curvas de amplificación. Se determinó la positividad de la muestra con respecto a un determinado serotipo de DENV cuando se evidenció una curva de amplificación definida para un canal determinado.

Siendo una muestra positiva para DENV-1 cuando el canal para DENV-1 (verde) genera una curva de amplificación; de esta forma para los otros serotipos de dengue.

4.2. Adaptación de la semilla viral a la línea celular Vero-76

Una vez criopreservada la semilla viral, Se procedió a propagar el virus inoculando 200 μ L de la cepa nativa DENV-2 en la dilución 1:25 en frascos de 25 cm² con monocapa confluyente de células Vero-76.

Para la absorción viral, se incubó por 60 minutos a 37 °C. Luego de este periodo se adicionó 8 mL del medio de mantenimiento al 2% SBF y se dejó incubando por varios días hasta observar un efecto citopático de 75% aproximadamente. Se cosechó la suspensión viral y se criopreservó en alícuotas. Posteriormente se realizó 4 propagaciones virales más para continuar con la adaptación de la semilla viral a la línea celular Vero-76.

4.3. Protocolo para la PRNT para DENV-2

La PRNT para DENV-2 se realizó en base al método de Alvarez *et al.*, 2010 con algunas modificaciones.

4.3.1. Prueba de Plaqueo para DENV-2

- a. Se preparó 3 placas de 24 pozos para ser coloreadas a diferentes intervalos de tiempo según la aparición del efecto citopático.
- b. Se preparó una suspensión celular de $2,5 \times 10^5$ cel/mL en medio de crecimiento al 10% SBF y se adicionó 500 μ L/ pozo en las 3 placas. El medio de crecimiento fue ajustado a un pH: 6,9.
- c. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora en condiciones herméticas.
- d. Luego se preparó las diluciones del virus desde 10^{-1} hasta 10^{-7} usando medio mantenimiento al 2% SBF y se infectó con 50 μ L de DENV-2 en cada pocillo desde

la dilución 10^{-1} hasta 10^{-7} y en los pozos restantes se adicionó 50 μL de medio de mantenimiento al 2% de SBF para evaluar el control de células (ver figura 1), luego se selló las placas herméticamente y se incubó por 4 horas.

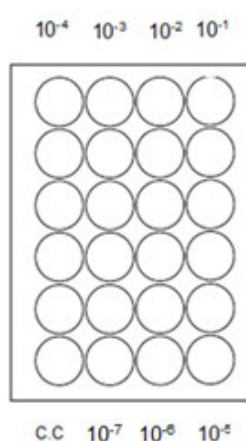
- e. Se adicionó 500 μL /pozo de medio de recubrimiento a las placas de 24 pozos y se sellaron herméticamente.
- f. Las placas se incubaron a 37° y se coloreó la placa según la aparición del efecto citopático.
- g. Se adicionó 500 μL de Azul negro de naftol en cada pozo y se dejó reposando hasta el día siguiente a temperatura ambiente.
- h. Se descartó el colorante.
- i. Finalmente se contó las y se determinó el título viral.
- j. Para conocer el título viral se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{UFP/mL} = P \times 20 \times 10^x$$

P : Promedio del número de placas obtenido del conteo (15-20 UFP)

20 : factor de conversión de μL a mL

10^x : factor de dilución viral



C.C: control de células

Figura 1: Esquema de la prueba de plaqueo para DENV-2

4.3.2. PRNT para anticuerpos neutralizantes contra DENV-2

- a. Se preparó una dilución viral que contenga un aproximado de 15-20 UFP/50 μ L para la PRNT. Para esto se preparó una suspensión viral de 30 UFP/50 μ L a 4°C.
- b. Se analizó 20 muestras séricas, las cuales 10 sueros son procedentes de pacientes de Lima y 10 sueros son procedentes de pacientes de Madre de Dios, con la finalidad de seleccionar los sueros positivos y sueros negativos mediante la PRNT. Para ello, las muestras séricas se inactivaron a 56°C por 30 minutos.
- c. Seguidamente se preparó varias diluciones de suero. Para el caso de los sueros procedentes de Lima las diluciones finales fueron 1:5; 1:10 y 1:20 y, para el caso de los sueros procedentes de Madre de Dios las diluciones finales fueron 1:160; 1:320 y 1:640.
- d. Una vez obtenida la suspensión viral en una concentración de 30 UFP/50 μ L y las diluciones de los sueros, se realizó la mezcla DENV-2 –suero y se incubó a 37°C por una hora en condiciones herméticas.
- e. Se prepararon placas de 24 pozos por el método de suspensión celular al $2,5 \times 10^5$ cel/mL y se incubó a 37°C por 1 hora en condiciones herméticas.
- f. Se inoculó 50 μ L de la mezcla virus-suero por duplicado para cada muestra. Además se establecieron 2 pozos de control de células, 2 pozos de control de virus y 2 pozos de control de virus en la dilución 1:10.
- g. Las placas se sellaron herméticamente y se incubaron a 37° C por 4 horas.
- h. Se adicionó 500 μ l /pozo de medio de recubrimiento a las placas.
- i. Las placas se incubaron a 37° C en condiciones herméticas hasta el día de coloración.
- j. Las placas se colorearon con 400 μ L de Azul Negro de Naftol y se dejó reposando hasta el día siguiente a temperatura ambiente.

k. Se realizó la lectura y cálculos.

- Se calculó el promedio del número de placas en el control de virus.
- Se calculó el porcentaje de reducción de placas para cada mezcla virus - suero en relación al promedio de control de virus. Cuando el porcentaje de reducción es mayor al 70% se considera que el suero problema es presenta anticuerpos neutralizantes contra el virus analizado.

4.4. Protocolo para optimizar la MNT para anticuerpos neutralizantes contra DENV-2

Para optimizar la prueba de microneutralización para DENV-2 se evaluó el método de monocapa completa recomendada por Roehrig *et al.*, 2008 y el método de suspensión celular en base al método de Juarez, 2009 con algunas modificaciones.

4.4.1. Optimización de la prueba de plaqueo para DENV-2 en placas de 96 pozos

4.4.1.1. Prueba de plaqueo para DENV-2 mediante el metodo de monocapa completa

- **Evaluación de la concentración de células para formar monocapa completa en placa de 96 pozos**
 - a. Se preparó distintas concentración de células para evaluar el crecimiento de células en placa de 96 pozos en una incubadora sin inyector de CO₂.
 - b. Las concentraciones a evaluar fueron 0,6 x10⁵ cel/mL, 0,9x10⁵ cel/mL, 1,2 x10⁵ cel/mL. Cada suspensión celular está diluida en medio de crecimiento al 10% y se dispensó 100 µL/pozo en una placa de 96 pozos.
 - c. Después de 48 horas, se descartó el medio de crecimiento y se adicionó 100 µL/pozo de medio de mantenimiento al 2% SBF.
 - d. La placa se incubó a 37°C durante 9 días. Para incubar las placas de 96 pozos se usó una incubadora sin CO₂ y se sellaron las placas.

- e. Se coloreó la placa con Azul negro de Naftol y se dejó a temperatura ambiente hasta el día siguiente.
- f. Se evaluó si la placa se mantuvo con monocapa completa.

- **Prueba de Plaqueo para DENV-2**

- a. Se preparó 3 microplacas para ser coloreadas a diferentes intervalos de tiempo para visualizar la aparición del efecto citopático.
- b. Se preparó 3 distintas suspensiones celulares de $0,6 \times 10^5$ cel/mL, $0,9 \times 10^5$ cel/mL, $1,2 \times 10^5$ cel/mL en medio de crecimiento al 10% SBF y se dispensó 100 μ L por pozo.
- c. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas en condiciones herméticas.
- d. Se preparó las diluciones del virus desde 10^{-1} hasta 10^{-8} usando medio mantenimiento al 2% a 4°C y se infectó con 100 μ L de DENV-2 en cada pocillo desde la dilución 10^{-1} hasta 10^{-8} . En los pozos restantes se adicionó 100 μ L de medio de mantenimiento al 2% SBF para evaluar el control de células (ver figura 2).
- e. Las placas se incubaron a 37° en condiciones herméticas y se coloreó la placa indicada de acuerdo a la aparición del efecto citopático.
- f. Para colorear la placa se descartó el medio presente en la placa.
- g. Se coloreó con 50 μ L de Azul Negro de Naftol en cada pozo y se dejó reposando hasta el día siguiente.
- h. Se descartó el colorante.
- i. Finalmente se evaluó la cantidad y el grado de infección de cada uno de los pozos para luego determinar el TCID₅₀ (Dosis infectiva del 50% en cultivo de células).

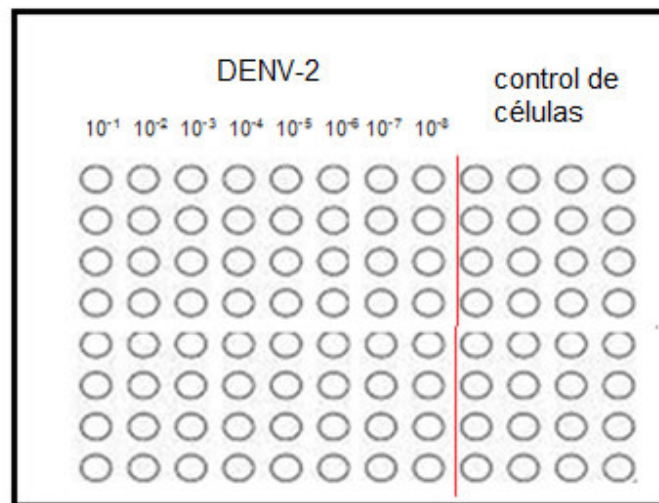


Figura 2: Esquema de la prueba de plaqueo para DENV-2 en placa de 96 pozos.

4.4.1.2. Prueba de plaqueo para DENV-2 mediante el método de suspensión celular

- **Evaluación de la concentración de células para formar monocapa completa en placa de 96 pozos**
 - a. Las concentraciones a evaluar fueron $0,6 \times 10^5$ cel/mL, $0,9 \times 10^5$ cel/mL, $1,2 \times 10^5$ cel/mL. Cada suspensión celular diluida en medio de mantenimiento al 2% (pH: 7,2) se dispensó 100 μ L/pozo en una placa de 96 pozos.
 - b. Después de 1 hora, se adicionó 100 μ L/pozo de medio de mantenimiento al 2% SBF.
 - c. La placa se incubó a 37°C durante 9 días en condiciones herméticas.
 - d. Se coloreó la placa con Azul negro de Naftol y se dejó a temperatura ambiente hasta el día siguiente.
 - e. Se evaluó si la placa se mantuvo con monocapa completa.

- **Prueba de plaqueo para DENV-2**

- a. Se preparó 3 microplacas para ser coloreadas a diferentes intervalos de tiempo según la aparición del efecto citopático. Además se evaluó los siguientes parámetros: Concentración de células y porcentaje de SBF.
- b. Se preparó las diluciones del virus desde 10^{-1} hasta 10^{-7} usando medio mantenimiento al 2% SBF a 4°C. Se dispensó 100 μ L de DENV-2 en cada pocillo desde la dilución 10^{-1} hasta 10^{-7} por triplicado. En los pozos restantes se adicionó 100 μ L de medio de mantenimiento al 2% SBF para el control de células.
- c. Las diluciones virales dispensadas en las placas se incubaron por 1 hora a 37°C.
- d. Se preparó 3 distintas suspensiones celulares de $0,6 \times 10^5$ cel/mL, $0,9 \times 10^5$ cel/mL y $1,2 \times 10^5$ cel/mL en medio de mantenimiento al 2% SBF (ver figura 3). Luego se dispensó 100 μ L por pozo en las microplacas según la distribución de los esquemas.
- e. Las placas se incubó a 37°C y se coloreo de acuerdo a la aparición del efecto citopático.
- f. Se coloreo con 50 μ L de Azul Negro de Naftol en cada pozo y se dejó reposando hasta el día siguiente.
- g. Finalmente se evaluó la cantidad y el grado de infección de cada uno de los pozos para luego determinar el TCID₅₀ de acuerdo a los parámetros evaluados.
- h. Posteriormente, una vez obtenido la concentración celular optima, se evaluó nuevamente la prueba de plaqueo con células en suspensión con medio de mantenimiento al 3% y 4% SBF (ver figura 4).

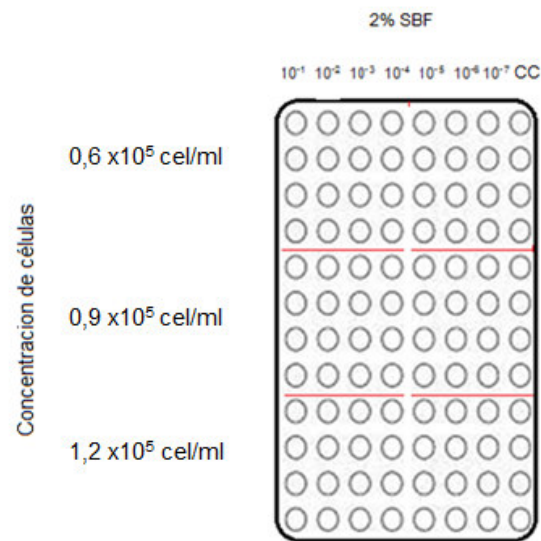


Figura 3: Esquema de la evaluación de la concentración de células con medio de mantenimiento al 2% SBF en la prueba de plaqueo para DENV-2.

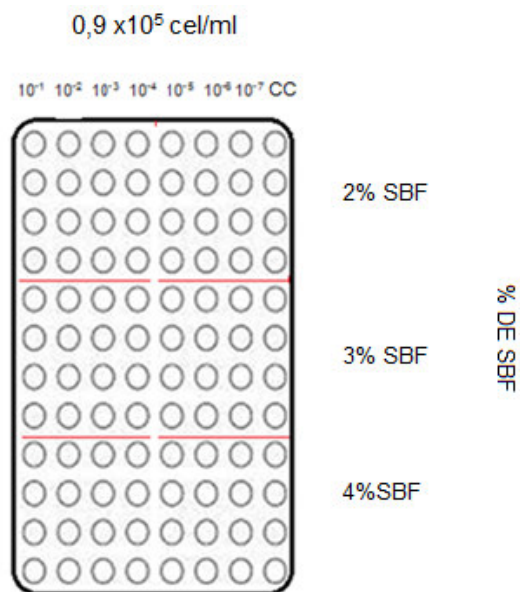


Figura 4: Esquema de la evaluación de la concentración óptima de células con el porcentaje de SBF en la prueba de plaqueo para DENV-2.

4.4.2. Optimización de la MNT para anticuerpos neutralizantes contra DENV-2

- Se evaluó 5 muestras séricas positivas a DENV-2, 5 muestras séricas negativas a DENV-2 y positivas a YFV y 5 muestras séricas negativas a DENV-2 y negativas a YFV negativo. Todas las muestras séricas fueron confirmado por PRNT para DENV-2 (ver figura 9, 10) y PRNT para YFV (ver figura 11 y anexo 3).
- Los sueros se sometieron a inactivación por calor (56°C x 30 min). Luego, se diluyó los sueros con medio de mantenimiento al 2% SBF.
- Se preparó varias diluciones finales de suero negativos a DENV-2 (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160) y suero positivo a DENV-2 (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640) para ello, se mezcló el suero diluido e inactivado con la dilución de trabajo del DENV-2 (100 TCID₅₀) tal como indica la tabla 1.

TABLA 3: Preparación de la mezcla virus-suero para la prueba de microneutralización para anticuerpos neutralizantes contra DENV-2

FILAS	SUERO PROBLEMA	MM 2% SBF	DILUCION	VIRUS (100TCID ₅₀)	DILUCION FINAL	VOLUMEN FINAL
A	40 µL (PURO)	60 µL	2/5 (100 µL)	50 µL	1/5	100 µL
B	50 µL (2/5)	50 µL	1/5 (100 µL)	50 µL	1/10	100 µL
C	50 µL (1/5)	50 µL	1/10 (100 µL)	50 µL	1/20	100 µL
D	50 µL (1/10)	50 µL	1/20 (100 µL)	50 µL	1/40	100 µL
E	50 µL (1/20)	50 µL	1/40 (100 µL)	50 µL	1/80	100 µL
F	50 µL (1/40)	50 µL	1/80 (100 µL)	50 µL	1/160	100 µL
G	50 µL (1/80)	50 µL	1/160 (100 µL)	50 µL	1/320	100 µL
H	50 µL (1/160)	50 µL	1/320 (100 µL)	50 µL	1/640	100 µL

TABLA 4: Preparación de las diluciones de suero para evaluar citotoxicidad.

FILAS	SUERO PROBLEMA	MM 2% SBF	DILUCION	MM 2% SBF	DILUCION FINAL	VOLUMEN FINAL
A	40 µL (PURO)	60 µL	2/5 (100 µL)	50 µL	1/5	100 µL
B	50 µL (2/5)	50 µL	1/5 (100 µL)	50 µL	1/10	100 µL
C	50 µL (1/5)	50 µL	1/10 (100 µL)	50 µL	1/20	100 µL
D	50 µL (1/10)	50 µL	1/20 (100 µL)	50 µL	1/40	100 µL
E	50 µL (1/20)	50 µL	1/40 (100 µL)	50 µL	1/80	100 µL
F	50 µL (1/40)	50 µL	1/80 (100 µL)	50 µL	1/160	100 µL
G	50 µL (1/80)	50 µL	1/160 (100 µL)	50 µL	1/320	100 µL
H	50 µL (1/160)	50 µL	1/320 (100 µL)	50 µL	1/640	100 µL

d. Se dispensó 100 µL de la mezcla virus-suero en cada pozo según el esquema.

Además se estableció el control de virus y el control de células.

e. Posteriormente, se preparó las diluciones finales de suero tal como indica la tabla 2 y se dispensó 100 µL de suero por duplicado para evaluar la citotoxicidad de las muestras de suero (ver figura 5).

f. Las placas se incubaron a 37°C por 1 hora.

g. Se preparó la suspensión celular a $0,9 \times 10^5$ cel/mL con medio de mantenimiento al 2% SBF y se dispensó 100 µL de suspensión celular por cada pozo.

h. Las placas se incubaron hasta el tiempo óptimo de coloreo a 37°C en condiciones herméticas.

- i. Transcurrido el tiempo óptimo para la coloración se descartó cuidadosamente el contenido de la placa y se coloreó con 70 μ L de azul negro de naftol, luego se dejó reposando hasta el día siguiente.
- j. La lectura de la prueba de microneutralización se realizó de la siguiente manera: 50% de desprendimiento celular a más, el suero problema se considera negativo, si no hay desprendimiento celular, el suero problema se considera positivo (Juarez, 2009). El 50% de monocapa celular está evidenciado como el TCID₅₀ y está incluido en los controles de la prueba, así como el control de virus (50 TCID₅₀) y el control de células.

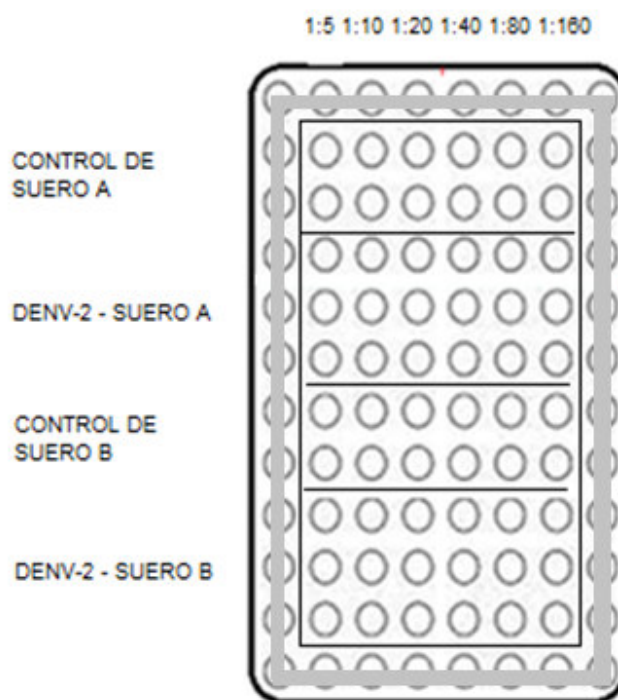


Figura 5: Esquema de la prueba de microneutralización para DENV-2 y prueba de citotoxicidad.

4.5. Análisis estadístico

Para este estudio, los resultados fueron representados en tablas univariadas, bivariadas y gráficos de barras. Adicionalmente, para medir la asociación que existe entre los resultados de los sueros analizados por la PRNT y MNT se empleó el coeficiente de correlación de Spearman usando el paquete estadístico SPSS versión 20.

V. RESULTADOS

5.1. Adaptación del DENV-2 a la línea celular Vero-76 para la optimización de la MNT

La semilla viral fue cosechada por primera vez al día 11 con un efecto citopático del 75% del total de la monocapa celular. Posteriormente se demostró la pureza de la semilla viral mediante la RT-PCR en tiempo real dando como resultado positivo a DENV-2 (ver figura 6).

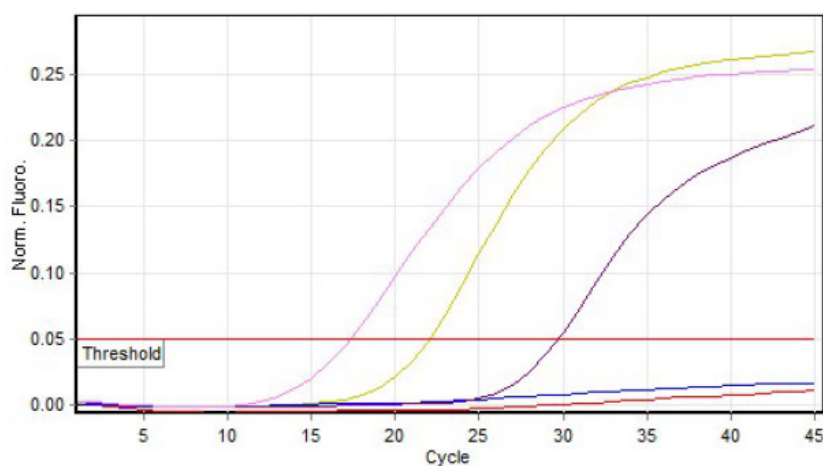


Figura 6: Curva de disociación: Identificación molecular de la cepa nativa de DENV-2 por RT-PCR Multiplex en tiempo real usando el fluorocromo “Hex”.

Para la adaptación de la cepa nativa DENV-2 a la línea Vero-76 se realizó 5 pasajes sucesivos y se determinó los días de incubación de acuerdo a la manifestación del efecto citopático tal como se observa en la tabla 5.

TABLA 5: Adaptación de la cepa nativa DENV-2 a línea celular Vero-76.

Nº Pasaje	Días de incubación	ECP
1	10 días	++
2	10 días	+++
3	9 días	+++
4	9 días	+++
5	9 días	+++

(++) : 50 % de desprendimiento celular

(+++): 75% de desprendimiento celular

Luego por cada pasaje viral se evaluó la semilla viral mediante la prueba de plaqueo en placas de 24 pozos. Las semillas virales relacionadas a los primeros pasajes mostraron placas no definidas; sin embargo, el quinto pasaje mostró placas definidas como se observa en la figura 8.

Igualmente, para la prueba de plaqueo de 96 pozos las semillas virales relacionadas a los primeros pasajes mostraron bajo desprendimiento celular en la primera dilución (10^{-1}); sin embargo, las semillas del quinto pasaje manifestaron un buen desprendimiento celular en mayores diluciones.

5.2. Concentración óptima de células Vero-76 para la prueba de microneutralización para DENV-2

Para la optimización de la MNT para DENV-2 se evaluaron 2 métodos: MNT por el método de monocapa completa y MNT por el método de suspensión celular. La MNT para DENV-2 por monocapa completa mostró un bajo desprendimiento celular y no se

diferenció el control de virus con el control de células como se observa en la figura 12; sin embargo, la MNT por suspensión celular mostró un buen desprendimiento celular que permite diferenciar el control del virus del control de células, siendo el método óptimo como se observa en la tabla 6.

TABLA 6: Evaluación de la prueba de microneutralización para DENV-2 usando el método de monocapa completa y suspensión celular.

Prueba de microneutralización para DENV-2			
Método	Células	ECP	Día de coloración
Monocapa completa	Vero-76	+	Décimo
Suspensión celular	Vero-76	+++	Décimo

(+) : 25 % de desprendimiento celular

(+++): 75% de desprendimiento celular

Obtenido el método óptimo, se evaluaron 3 concentraciones celulares: $0,6 \times 10^5$ cel/mL; $0,9 \times 10^5$ cel/mL, $1,2 \times 10^5$ cel/mL mediante la prueba de plaqueo de 96 pozos usando como medio de suspensión medio de mantenimiento al 2% SBF. Como resultados tal como se observa en la figura 14 se obtuvo que la concentración óptima de células Vero-76 fue $0,9 \times 10^5$ cel/mL debido a que se observó una monocapa completa al 100% y el TCID₅₀ en la dilución 10^{-3} . Con respecto a la concentración $0,6 \times 10^5$ cel/mL, el control de células no hizo monocapa completa al 100% por ser muy poca concentración celular y con respecto a la concentración de $1,2 \times 10^5$ cel/mL el control de células se observó una monocapa completa al 100% más densa que el control de células y el TCID₅₀ fue en la dilución 10^{-3} así como se observa en la tabla 7.

TABLA 7: Evaluación de la concentración celular Vero-76 usando 2% de SBF en el medio de mantenimiento para optimizar la prueba de microneutralización para DENV-2.

2% SBF							
Concentración Celular (cel/mL)	TCID ₅₀				% de confluencia de la monocapa del CC		
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	50%	75%	100%
0,6 x 10 ⁵				X		X	
0,9 x 10 ⁵			X				X
1,2 x 10 ⁵			X				X

Posteriormente, se evaluó la concentración óptima con 3 porcentajes de SBF y se determinó que el medio de mantenimiento al 2% SBF fue el porcentaje óptimo de SBF como se observa en la tabla 8.

TABLA 8: Evaluación de la concentración celular óptima (0,9 x 10⁵ cel/mL) usando 2%, 3% y 4% de SBF en el medio de mantenimiento para optimizar la prueba de microneutralización para DENV-2.

0,9 x 10 ⁵ cel/mL							
% SBF	TCID ₅₀				% de confluencia de la monocapa del CC		
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	50%	75%	100%
2%			X				X
3%		X					X
4%		X					X

5.3. Dosis infectiva del 50% en cultivo de células (TCID₅₀) del *stock* de semilla viral para la prueba de microneutralización para DENV-2

Una vez realizado la adaptación de DENV-2 a la línea celular, obtenido la concentración óptima de células y el porcentaje de SBF óptimo en el medio de mantenimiento se determinó el TCID₅₀ a partir de la prueba de plaqueo para DENV-2 que se observa en la figura 14. El TCID₅₀ según el método de Reed y Muench fue 10^{-3,48}.

TABLA 9: Titulación del DENV-2 mediante la prueba de plaqueo en placa de 96 pozos al décimo día de coloración.

Titulación de DENV-2				Valores acumulados			
				Mortalidad			
Dilución del virus	Proporción	Pocillos infectados	Pocillos sin infectar	Pocillos infectados	Pocillos sin infectar	Proporción	%
10 ⁻¹	8/8	8	0	24	0	24/24	100
10 ⁻²	8/8	8	0	16	0	16/16	100
10 ⁻³	5/8	5	3	8	3	8/11	72
10 ⁻⁴	3/8	3	5	3	8	3/11	27
10 ⁻⁵	0/8	0	8	0	16	0/16	0
10 ⁻⁶	0/8	0	8	0	24	0/24	0
10 ⁻⁷	0/8	0	8	0	32	0/32	0
10 ⁻⁸	0/8	0	8	0	40	0/40	0

Calculando el TCID₅₀ del DENV-2 según el método de Reed y Muench:

$$\frac{(72-50)}{(72-27)} = 0,48; (-3) + (-0,48) = -3,48; \text{TCID}_{50} = 10^{-3,48}$$

Por lo tanto, la dilución que contiene 100 TID₅₀ = 10^{-1,48}

5.4. Determinación del día óptimo de coloración para la prueba de microneutralización para DENV-2

Para determinar el día óptimo de coloración para la MNT para DENV-2 se evaluaron los días 9,10 y 11 en la prueba de plaqueo para DENV-2 en placa de 96 pozos. Se determinó el décimo día como el día óptimo de coloreo debido a que el control de células se mantuvo en monocapa completa al 100% y el TCID₅₀ fue en la dilución 10^{-3,48}. En el décimo primer día el control de células no se mantuvo en monocapa completa y en el noveno día el TCID₅₀ fue menor a 10^{-3,48}.

5.5. Evaluación de la citotoxicidad del suero en la prueba de microneutralización para DENV-2

Se evaluaron varias diluciones de suero en la MNT, desde la dilución 1:5 hasta la dilución 1:640, las cuales se evaluó la toxicidad de los sueros versus la mezcla virus-suero. Se pudo determinar que mediante la PRNT no se detectó citotoxicidad en ninguna de las diluciones y mediante la MNT para DENV-2 no se detectó citotoxicidad en ninguna de las diluciones como se observa en la figura 21.

5.6. Evaluación de la reacción cruzada entre YFV y DENV-2 en la prueba de microneutralización para DENV-2

Se evaluaron 5 sueros control seronegativos a DENV-2 y seropositivos a YFV con 5 sueros control seronegativos a DENV-2 y YFV. Las muestras se evaluaron mediante la PRNT para DENV-2 y mediante la MNT para DENV-2 y para la evaluación de reacciones cruzadas se consideraron las primeras diluciones (1:5; 1:10; 1:20). Se determinó que por la PRNT no hubo reacción cruzada en la dilución 1:5; sin embargo, mediante la MNT para DENV-2, los 5 sueros negativos a DENV-2 y YFV han evidenciado reacción cruzada entre las diluciones 1:5 y 1:10 como se observa en las microplacas correspondientes a la figura 16 y figura 17 y los 5 sueros negativos a DENV-2 y positivos a YFV evidenciaron

reacción cruzada entre las diluciones 1:10 y 1:20 como se observa en la microplaca correspondientes a la figura 18.

5.7. Comparación de los niveles de anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 obtenidos por PRNT y MNT

Previamente se evaluaron 19 muestras séricas mediante la PRNT, las cuales 4 sueros procedentes de zona endémica no se consideraron para el estudio porque presentaron anticuerpos neutralizantes a DENV-2 menor a 1:160 como se observa en la figura 10 y solo se seleccionaron 15 sueros para el estudio. Se evaluaron 15 muestras séricas por PRNT y MNT y como resultados se obtuvo que:

- Mediante la PRNT contra DENV-2, 10 sueros fueron negativos DENV-2 a partir de la dilución 1:5; sin embargo, mediante la MNT para DENV-2, 5 sueros negativos a DENV-2 y negativos a YFV fueron negativos hasta la dilución 1:10 y los 5 sueros negativos a DENV-2 y positivos a YFV fueron negativos hasta la dilución 1:20.
- Mediante la PRNT contra DENV-2, los dos primeros sueros fueron positivos hasta la dilución 1:160 y 1:320 respectivamente y los 3 sueros restantes fueron positivos hasta la dilución 1:640; sin embargo, mediante la MNT para DENV-2, los dos primeros sueros fueron positivos hasta la dilución 1:40 y 1:80 respectivamente y los 3 sueros restantes fueron positivos en las diluciones 1:640 como se observa en la figura 19 y figura 20.

Los resultados se observan en la tabla 11 y en la figura 7 se observa un diagrama de barras donde se compara los niveles de anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 obtenidos por PRNT y MNT.

TABLA 10: Evaluación de 5 Sueros negativos a DENV-2 y YFV, 5 Sueros negativos a DENV-2 y positivos a YFV y 5 Sueros positivos a DENV-2 y YFV mediante la PRNT para DENV-2 y la MNT para DENV-2.

Grupo de suero	N° Suero	Dilución de anticuerpos neutralizantes a DENV-2		Dilución de anticuerpos neutralizantes a YFV por PRNT
		PRNT	MNT	
zona no endémica DENV-2(-) YFV (-)	1	< 1:5	1:10	< 1:10
	2	< 1:5	1:10	< 1:10
	3	< 1:5	1:10	< 1:10
	4	< 1:5	1:10	< 1:10
	5	< 1:5	1:10	< 1:10
zona no endémica DENV-2 (-) YFV (+)	6	< 1:5	1:20	1:10
	7	< 1:5	1:20	1:10
	8	< 1:5	1:10	1:10
	9	< 1:5	1:10	1:10
	10	< 1:5	1:20	1:10
zona endémica DENV-2 (+) YFV (+)	11	1:160	1:40	1:10
	12	> 1:640	1:640	1:10
	13	> 1:640	1:640	1:10
	14	1:320	1:80	1:10
	15	> 1:640	1:640	1:10

NOTA: Los sueros fueron evaluados por duplicado mediante la PRNT para DENV-2 y por triplicado mediante la prueba de microneutralización para DENV-2.

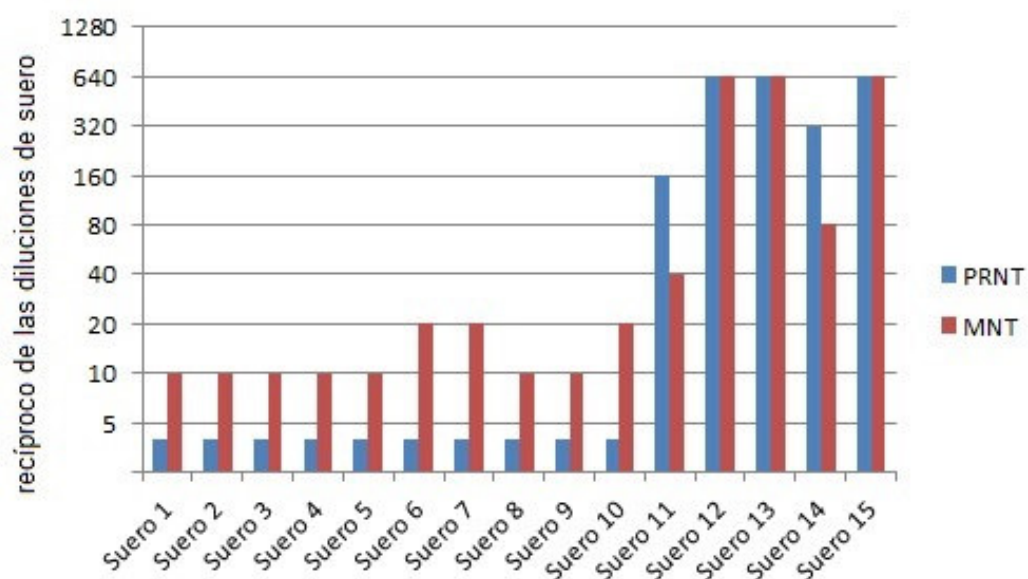


Figura 7: Títulos de anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 de los 15 sueros evaluados por la PRNT para DENV-2 y por la MNT para DENV-2.

Luego, se realizó el análisis estadístico de los resultados de los títulos de las 15 muestras séricas evaluadas por PRNT para DENV-2 y MNT para DENV-2 mediante el coeficiente de correlación de Spearman se obtuvo un valor de $p < 0,05$ y $R = 0,887$, siendo estadísticamente significativo la asociación entre las 2 variables.

VI. DISCUSIÓN

La PRNT es una prueba altamente sensible y específica que permite discriminar los cuatro serotipos de DENV a partir de la detección de anticuerpos neutralizantes brindando resultados confirmatorios tal como describe Timiryasova *et al.*, 2013. La PRNT para DENV-2 usada como “gold standard” en este estudio se desarrolló según el método de Alvarez *et al.*, 2010 con algunas modificaciones. El método de Alvarez *et al.*, 2010 describe el uso del método semisólido con células Vero en suspensión celular usando la cepa de referencia DENV-2 SP 16803 procedente de Tailandia obteniendo placas definidas a los 7 días y este estudio describe el empleo células en suspensión celular a una concentración celular de $2,5 \times 10^5$ cel/mL usando una cepa nativa de DENV-2 procedente de Madre de Dios, Perú y medio de recubrimiento al 6% CMC obteniendo placas definidas a los 8 días. A su vez, Alvarez *et al.*, 2010 mencionan que mediante el método semisólido con células Vero en monocapa completa recomendado por la OMS no evidencia placas definidas, probablemente esas diferencias se deba a la cepa de DENV-2 empleada o a la concentración de CMC empleada en el medio de recubrimiento.

En el presente estudio, la adaptación de la cepa nativa de DENV-2 a la línea celular ha sido importante para optimizar la prueba de microneutralización para DENV-2. En la PRNT para DENV-2 se puede notar que en los pasajes más bajo las placas virales no son definidas; sin embargo, en el último pasaje las placas virales son definidas como se observa en la figura 8 y significa que son necesarios los pasajes sucesivos del virus para la optimización del PRNT así como mencionan Liu *et al.*, 2004. De la misma manera, la MNT para DENV-2 evidenció poco desprendimiento celular en los pasajes más bajos y en los últimos pasajes el desprendimiento celular es mayor, necesario para diferenciar una muestra positiva de una muestra negativa.

Para determinar la concentración óptima de células Vero-76 en la MNT para DENV-2, en primer lugar, se evaluó el método por monocapa completa y el método por suspensión celular. Como resultado se obtuvo que el método por suspensión celular fue el método óptimo para este estudio debido a que la semilla viral que se usó en este estudio presenta un efecto citopático débil, siendo la característica determinante para poder optimizar la MNT para DENV-2. En consecuencia, se ha tenido que establecer las mínimas condiciones para que se pueda mantener las células Vero-76 en monocapa completa durante 10 días y muestre un mayor efecto citopático en el control de virus, las cuales se encontró que la concentración óptima de células Vero-76 fue $0,9 \times 10^5$ cel/mL. La concentración $0,6 \times 10^5$ cel/mL mostró una monocapa incompleta en el control de células y no se consideró como concentración celular óptima. Con respecto a la concentración celular $1,2 \times 10^5$ cel/mL, mostró una monocapa completa durante los 10 días en el control de células, sin embargo, la monocapa celular fue más densa y el efecto citopático de la cepa nativa DENV-2 no fue muy marcado, en la mayoría de las pruebas realizadas solo se evidenció el TCID₅₀ hasta la dilución 10^{-2} , por lo tanto, es necesario considerar $0,9 \times 10^5$ cel/mL como concentración óptima para la MNT para DENV-2 porque cumple con las mínimas condiciones para que el control de células Vero- 76 se pueda mantener en monocapa completa durante 10 días y el control de virus muestre un mayor efecto. Además, se evaluó el porcentaje de SBF que debe tener el medio de mantenimiento para la optimización de la MNT. El SBF tiene los factores de crecimiento, hormonas, minerales, lípidos y otros micronutrientes, que al ser usados en concentraciones apropiadas en el medio de cultivo, suplen satisfactoriamente los requerimientos metabólicos que garantizan la proliferación y adhesión celular (Escobar *et al.*, 2011). Para este estudio, se evaluó los distintos porcentajes de SBF para evaluar el porcentaje óptimo. En los resultados se evidenció que para la MNT el porcentaje óptimo de SBF fue 2% lo cual permite la formación de una monocapa confluyente menos densa que permite evidenciar un mejor

efecto citopático; en contraste, al adicionar 3% SBF y 4% SBF, se observó una monocapa celular completa más densa no apta para virus que no manifiestan un efecto citopático agresivo, posiblemente porque al evaluar la prueba de plaqueo se mostró un menor efecto citopático teniendo el TCID₅₀ en 10⁻². En el estudio de Juárez, 2009, reporta el uso de una concentración de células Vero-76 a 5 x 10⁵ cel/mL con el método de suspensión celular y el uso de medio de mantenimiento al 3% SBF para la MNT para el virus Rocío y virus Ilheus; y Li *et al.*, 2011 reportan el uso una concentración de células Vero a 1 x 10⁴ cel/mL con el método de monocapa completa para la MNT para DENV-2 (cepa procedente de Nueva Guinea), las cuales, comparando con la MNT para DENV-2 del presente estudio, se evidenciaría que el método a usar, la concentración celular y el % de SBF dependerían del virus y la cepa en estudio para obtener buenos resultados.

Entonces, para determinar el TCID₅₀ del *stock* de semilla viral para la prueba de microneutralización para DENV-2, ha sido necesario realizar la adaptación de DENV-2 a la línea celular Vero-76, obtener la concentración óptima de células y obtener el porcentaje de SBF óptimo en el medio de mantenimiento. En consecuencia, se determinó mediante la titulación del DENV-2 en placas de 96 pozos por el método de Reed y Muench que el TCID₅₀ fue 10^{-3,48}. El estudio de Juárez, 2009 describe que el TCID₅₀ obtenido en la MNT para el virus Rocío fue 10^{-5,17} y el TCID₅₀ obtenido en la MNT para el virus Ilheus fue 10^{-6,36}. El valor del TCID₅₀ se explicaría debido a que solo se hizo pasajes sucesivos en la línea celular Vero-76. El estudio de Rodríguez *et al.*, 2011, indica que los títulos virales son superiores cuando se hace pasajes sucesivos en la línea celular C6/36; sin embargo, para el presente estudio fue necesario la adaptación del virus a la línea celular Vero-76 con los pasajes sucesivos, sin exceder la cantidad de veces recomendado en los estudio de Roehrig *et al.*, 2008 y Medina *et al.*, 2012. Además, Medina *et al.*, 2012

describe que el DENV no alcanza títulos tan altos como otros virus para uso en ensayos biológicos.

Sobre el día óptimo de coloración, la MNT para DENV-2 brinda resultados al décimo día y la PRNT para DENV-2 brinda resultados al octavo día de coloración tal como coincide con los estudios de Alvarez *et al.*, 2010 y la Roehrig *et al.*, 2008. Para la MNT es necesario que el virus desprenda la monocapa celular y a su vez se mantenga el control de células en monocapa completa sin tener un exceso de desprendimiento celular por envejecimiento celular por los mismos productos tóxicos liberados al medio, siendo el décimo día el día óptimo de coloración. En el estudio de Juarez, 2009, el día de coloración de la MNT para el virus Rocio y virus Ilheus usando células Vero-76 fue 7 y 4 días respectivamente, siendo menor que el día óptimo presentado en este estudio, las cuales se explicaría dicha variación por el tipo de virus en estudio a pesar que pertenecen a la misma familia Flaviviridae.

Con respecto a la toxicidad de los sueros, las altas concentraciones de suero podrían alterar la morfología de la monocapa interfiriendo con los resultados de la prueba y reportando falsos positivos (Logan *et al.*, 2016), además siendo necesario la evaluación de la toxicidad de los sueros. En la optimización de la MNT se realizaron pruebas de citotoxicidad en la línea celular Vero-76 en sus distintas diluciones desde 1:5 hasta 1:640 y como resultados se evidenció que los 15 sueros no presentaron toxicidad en las células Vero-76 en ninguna de las diluciones, posiblemente se debe porque las muestras séricas fueron almacenados en excelentes condiciones (-80°C) para evitar la descomposición del suero, porque no se trabajó con sueros hemolizados y porque se inactivó el sistema de complemento a 56°C x 30 min así como lo recomienda Huaman *et al.*, 2008.

Con respecto a la evaluación de reacción cruzada entre el YFV y DENV-2, Alvarez *et al.*, 1998 reportó que la menor dilución de suero capaz de diferenciar ambos virus fue 1:5

mediante la PRNT para DENV-2 y en este estudio, la dilución de suero 1:5 no mostró reacción cruzada; sin embargo, de los resultados obtenidos de la evaluación de reacción cruzada mediante la MNT se concluye que se debe considerar la dilución 1:40 para discriminar un suero positivo de un suero negativo. Esto se corrobora con lo reportado en estudios con otros flavivirus tales como en el estudio de seroprevalencia de DENV-3 desarrollado por Idris *et al.*, 2013 y en el estudio de detección de anticuerpos neutralizantes contra los virus Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo desarrollado por Juarez, 2009.

En este estudio se realizó una comparación de los niveles de anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 obtenidos por PRNT y MNT. A partir de los 15 sueros analizados desde la dilución 1:5 hasta 1:640, se determinó por la MNT que 3 sueros son positivos a DENV-2 hasta la dilución 1:640 y a su vez son positivos a DENV-2 hasta la dilución 1:640 por la PRNT; sin embargo, se determinó que por la MNT un suero fue positivo a DENV-2 en la dilución 1:40 y por la PRNT fue positivo a DENV-2 en la dilución 1:160. También se determinó que otro suero fue positivo a DENV-2 en la dilución 1:80 y por la PRNT fue positivo a DENV-2 en la dilución 1:320 observándose, en general, una gráfica que muestra los 15 sueros evaluados por la PRNT y MNT para DENV-2 detallado en la figura 7 y según el análisis estadístico, la correlación de los títulos de las 15 muestras séricas tanto por PRNT para DENV-2 y MNT para DENV-2 ha sido estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Putnak *et al.*, 2008 describen que ninguna prueba será superior o reemplazará a la PRNT por ser más sensible que la MNT y se corrobora con el presente estudio; sin embargo, para determinar la presencia y/o ausencia de anticuerpos que neutralizan a 50 TCID₅₀ del virus es ideal la MNT porque se puede procesar un mayor número de muestras séricas en un menor tiempo por ensayo con ahorro de materiales y medios (CDC, 2016), la cual permitiría realizar una vigilancia epidemiológica a mayor escala.

Con respecto al límite de detección de la prueba de microneutralización para DENV-2, las muestras séricas se evaluaron hasta la dilución 1:640, las cuales 3 de 5 sueros evidenciaron títulos de anticuerpos hasta 1:640. Estos títulos de anticuerpos neutralizantes brindan una mayor confianza que las muestras séricas evaluadas procedan de personas que hayan presentado una infección contra DENV-2 (Buddhari *et al.*, 2014), pudiendo esta prueba detectar títulos de anticuerpos hasta la dilución 1:640 y quizás diluciones mayores.

Para optimizar la MNT se realizó los ensayos en placas de 96 pozos en sistema cerrado. El CO₂ cumple un rol importante en la regulación del pH y en la optimización de la prueba se han suplido las necesidades de usar una incubadora con inyector de CO₂ para así usar y aprovechar el CO₂ que las células emiten regulando el pH en un sistema cerrado con buenos resultados. Además, se evitó trabajar los pozos de la periferia de la placa de 96 pozos para evitar contaminación por manipulación de la placa y para evitar una lectura errónea por un mayor desprendimiento de la monocapa celular ocasionado por el ingreso de O₂ durante los 10 días de incubación en los pozos que se encuentran en los bordes de las placas siendo no útil para poder brindar resultados confiables.

Con respecto al costo y efectividad de la prueba, la teoría menciona que la prueba de microneutralización tiene sus ventajas con respecto a la PRNT, debido a que mejora el rendimiento de la prueba procesando un mayor número de muestras séricas en un menor tiempo por ensayo con ahorro de materiales y medios (CDC, 2016). Además, se infiere que se puede analizar 12 muestras por placas en la MNT y 6 muestras por placa en la PRNT, analizando el doble de número de muestras séricas por placa mediante la MNT. Asimismo, la optimización de la prueba de microneutralización para DENV-2 tiene muchas ventajas. La concentración celular usado en la PRNT fue $2,5 \times 10^5$ cel/mL y la concentración celular optimizada en la microneutralización fue $0,9 \times 10^5$ cel/mL por lo que

se redujo la concentración celular en un 64%. En este estudio se optimizó la MNT usando solo medio de mantenimiento al 2% SBF, la cual redujo enormemente los costos de los insumos principalmente por SBF en un 83%. El tiempo del ensayo para analizar 15 muestras séricas mediante la PRNT fue 12 horas y el tiempo de ensayo optimizado por la prueba de microneutralización fue 5 horas, por lo que se redujo el tiempo del ensayo en 7 horas; sin embargo, el tiempo de incubación de la prueba de microneutralización fue de 10 días y el de la PRNT fue de 8 días. Finalmente, ambas pruebas cumplen el mismo fundamento inmunológico, siendo la MNT para DENV-2 una prueba eficiente para discriminar un suero positivo de un suero negativo; sin embargo, los resultados de Li *et al.*, 2011 indican la aplicación de la MNT en formato ELISA debido a que la MNT convencional no manifiesta efecto citopático, demostrándose en este estudio que se pudo lograr la optimización de la MNT para poder diferenciar una prueba positiva de una negativa mediante la observación del efecto citopático, disminuyendo los gastos en comparación a la MNT en formato ELISA ya que utiliza insumos adicionales para la realización del inmunoensayo.

VII. FIGURAS

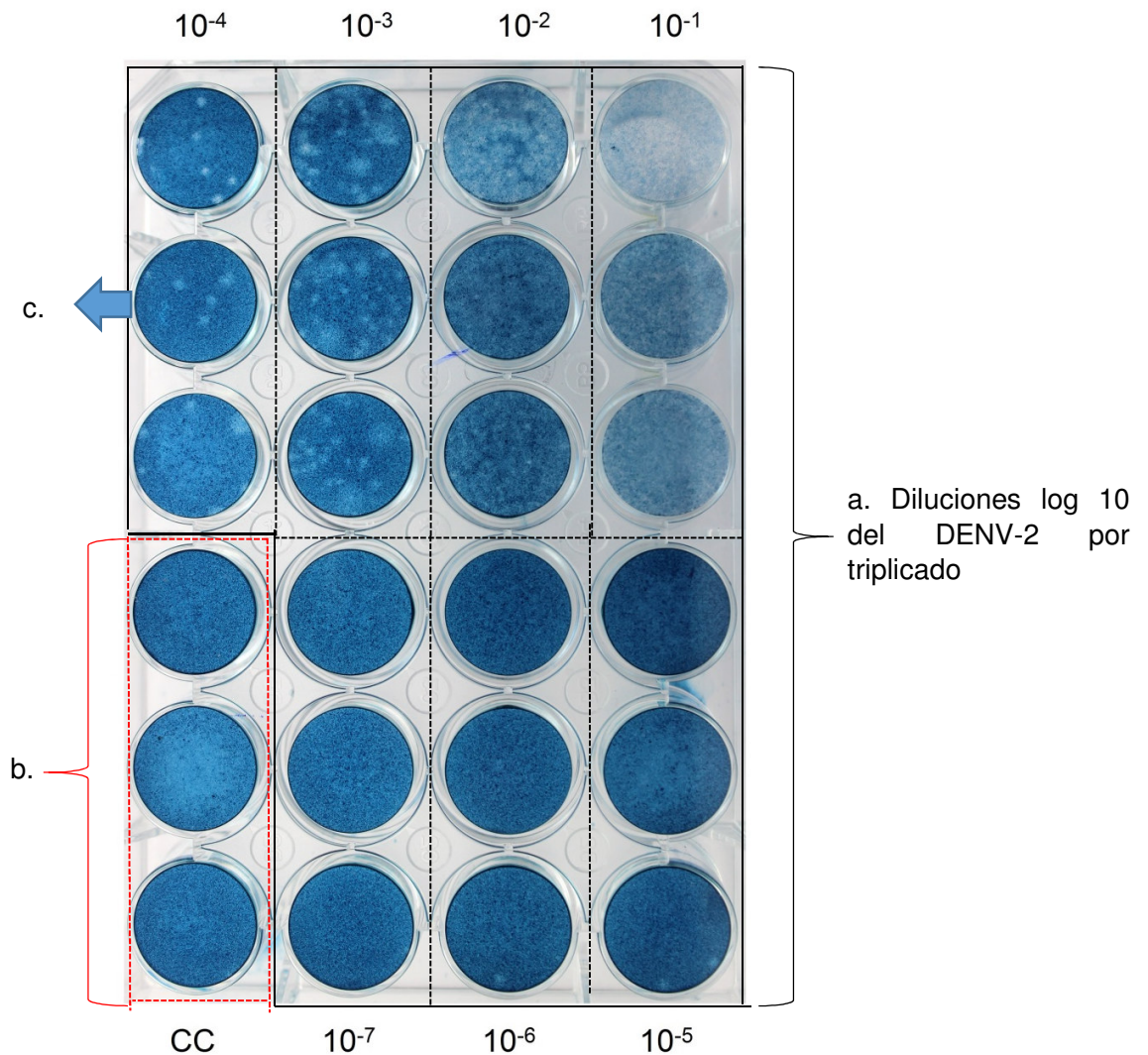


Figura 8: Prueba de plaqueo para DENV-2 por el metodo semisólido usando células Vero-76 en suspensión y medio de recubrimiento al 6%CMC.

- a. Diluciones log10 del DENV-2 desde la dilución 10⁻¹ hasta 10⁻⁷ por triplicado.
- b. Control de células (CC)
- c. Dilución óptima para obtener el título viral a partir del conteo de placas.

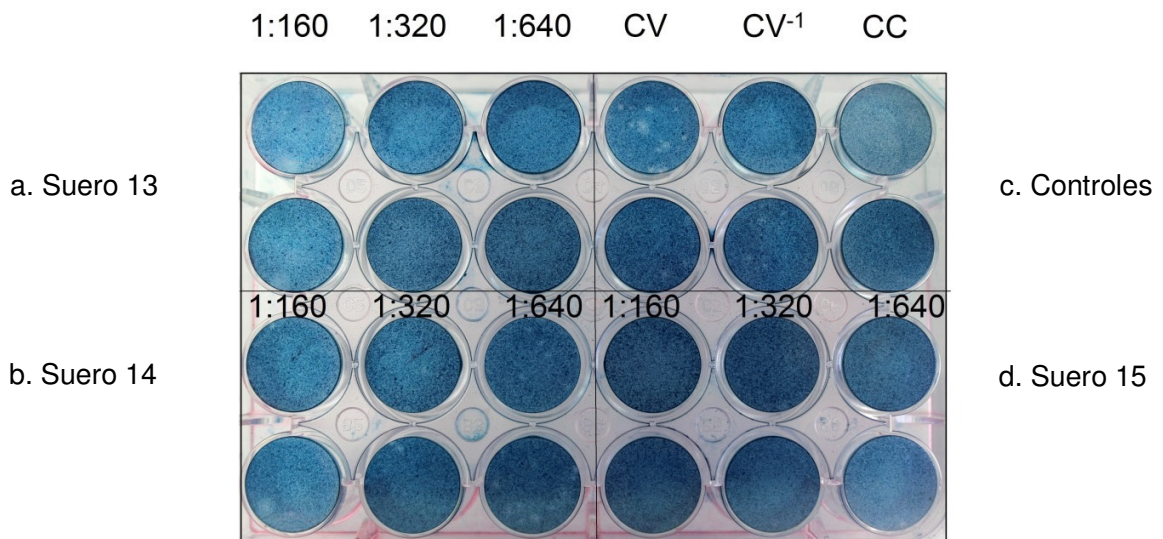


Figura 9: PRNT₇₀ para la selección de sueros positivos a DENV-2 procedente de zona endémica (Madre de Dios).

- El suero 13 es seropositivo a DENV-2 en la dilución 1:640.
- El suero 14 es seropositivo a DENV-2 en la dilución 1:320.
- El suero 15 es seropositivo a DENV-2 en la dilución 1:640.
- Controles de la prueba: control de virus (CV), control de células (CC).

NOTA: Los sueros seropositivos a DENV-2 presentan un porcentaje mayor al 70% de reducción en comparación al control de virus.

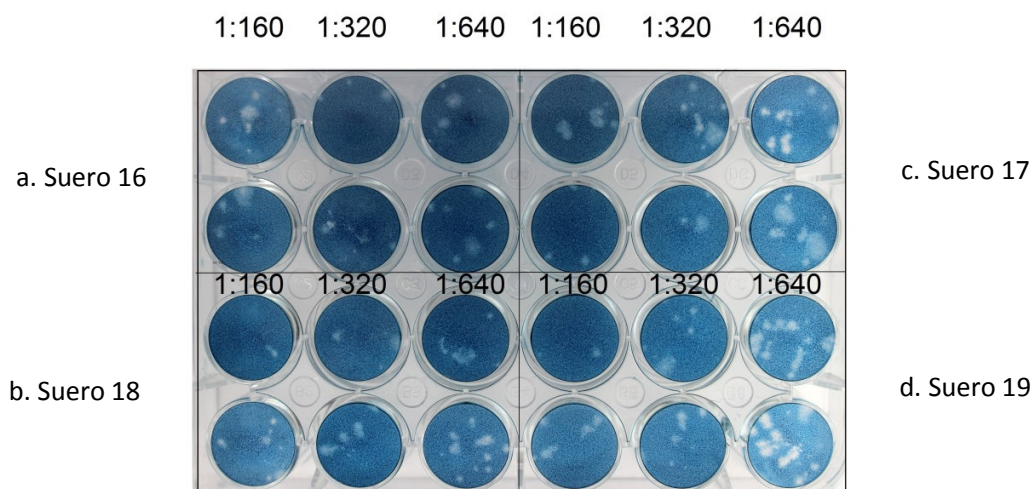


Figura 10: PRNT₇₀ para la selección de sueros positivos a DENV-2 procedente de zona endémica (Madre de Dios).

- a. El suero 16 es seronegativo a DENV-2 en la dilución 1:160.
- b. El suero 17 es seronegativo a DENV-2 en la dilución 1:160.
- c. El suero 18 es seronegativo a DENV-2 en la dilución 1:160.
- d. El suero 19 es seronegativo a DENV-2 en la dilución 1:160.

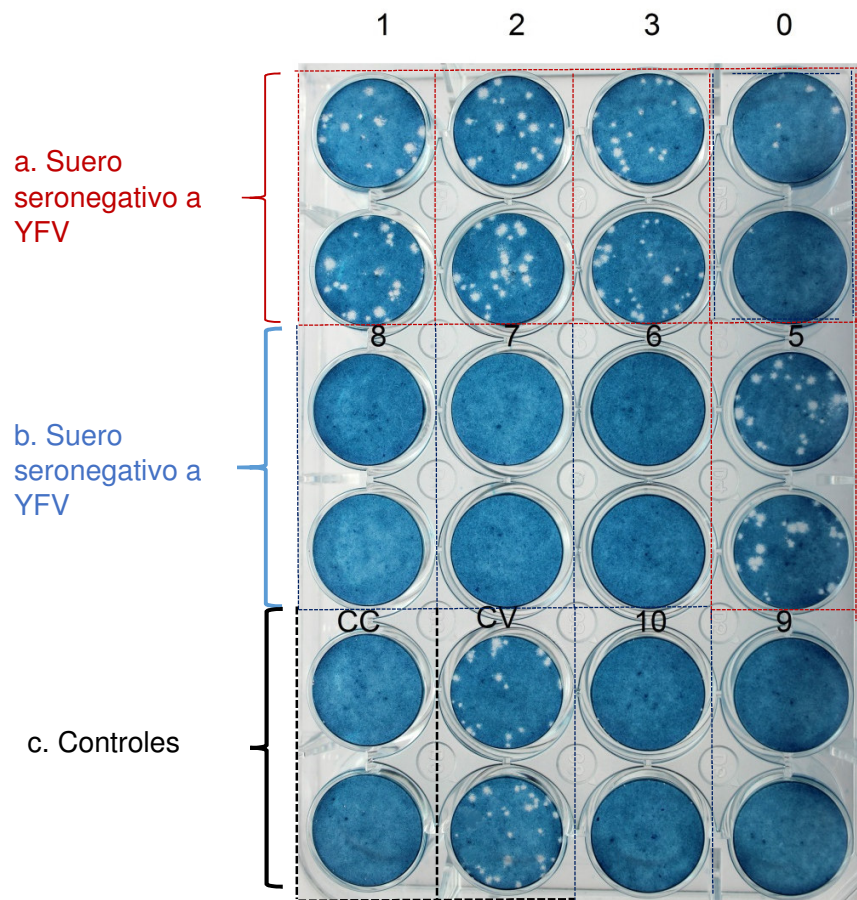


Figura 11: PRNT₇₀ para la selección de sueros seronegativos y seropositivos a YFV evaluados en la dilución 1:10. La PRNT₇₀ para YFV se realizó mediante el método de monocapa completa usando la cepa de YFV-17D.

- a. Los suero 1, 2, 3 y 5 son sueros seronegativos a YFV
- b. los sueros 0, 8, 7, 6, 9 y 10 son sueros seropositivos a YFV.
- c. Control de virus (CV) y control de células (CC)

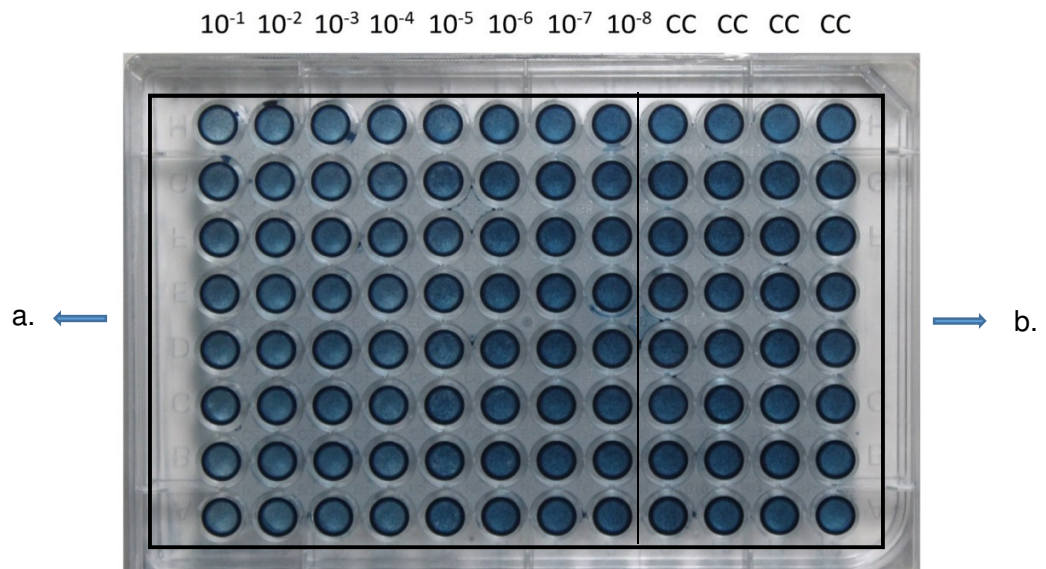


Figura 12: Prueba de plaqueo para DENV-2 realizado mediante el método de monocapa completa de células Vero-76 en placa de 96 pozos.

- a. Evaluación de las diluciones log10 de DENV-2 desde 10^{-1} hasta 10^{-8} . Mediante el método de monocapa completa no se evidencia desprendimiento celular en ninguna de las diluciones.
- b. Control de células (CC).

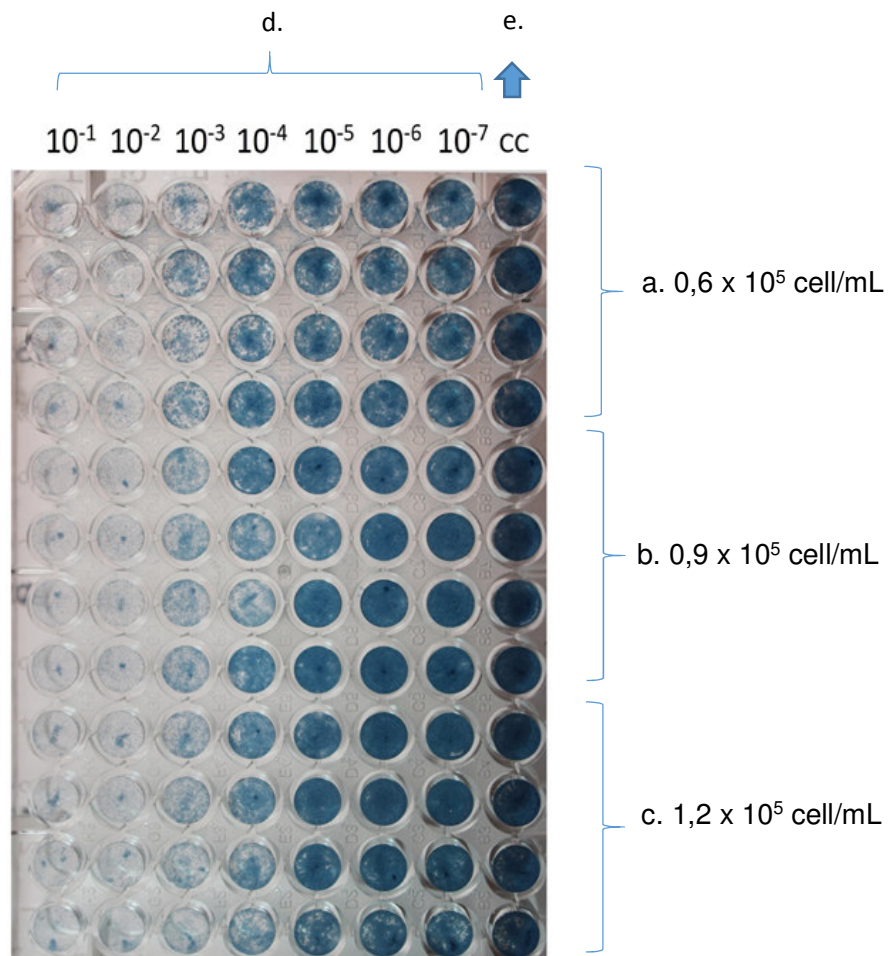


Figura 13: Optimización de la MNT para DENV-2 por el método de suspensión celular evaluando 3 concentraciones celulares suspendidos en medio de mantenimiento al 2% de SBF.

- Evaluación de la prueba de plaqueo usando células Vero-76 a una concentración celular de $0,6 \times 10^5$ cel/mL (Concentración no óptima).
- Evaluación de la prueba de plaqueo usando células Vero-76 a una concentración celular de $0,9 \times 10^5$ cel/mL (concentración óptima).
- Evaluación de la prueba de plaqueo usando células Vero-76 a una concentración celular de $1,2 \times 10^5$ cel/mL (concentración no óptima).
- Diluciones log10 de DENV-2 desde 10^{-1} hasta 10^{-7} .
- Control de células (CC).

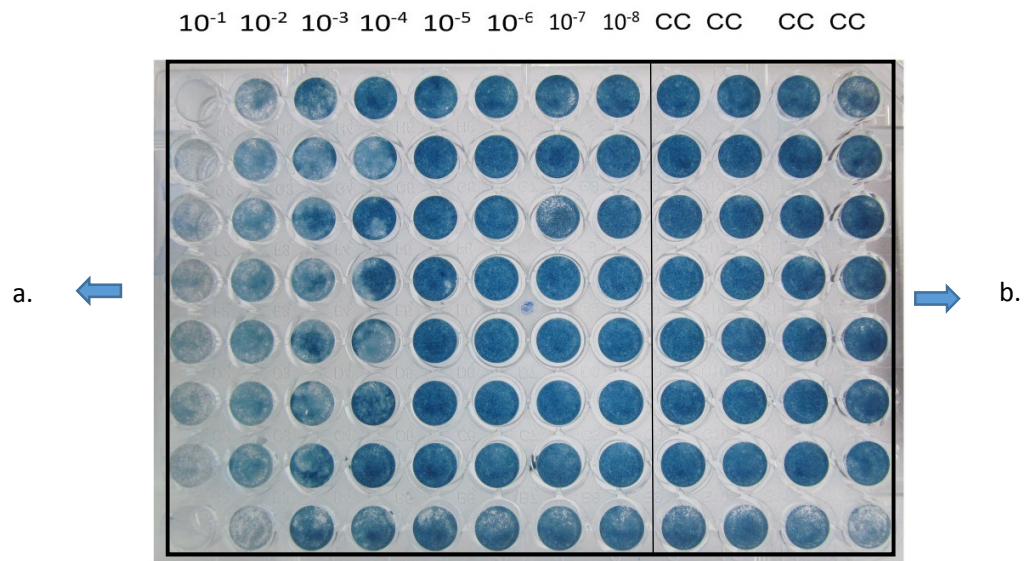


Figura 14: Prueba de plaqueo para DENV-2 realizado mediante el método de suspensión celular de Vero-76 en placa de 96 pozos.

- a. Evaluación de las diluciones log10 de DENV-2 desde 10^{-1} hasta 10^{-8} . Mediante el método de suspensión celular se evidencia desprendimiento celular en los pocillos y el $TCID_{50}$ es determinado entre la dilución 10^{-3} y 10^{-4} .
- b. Control de células (CC).

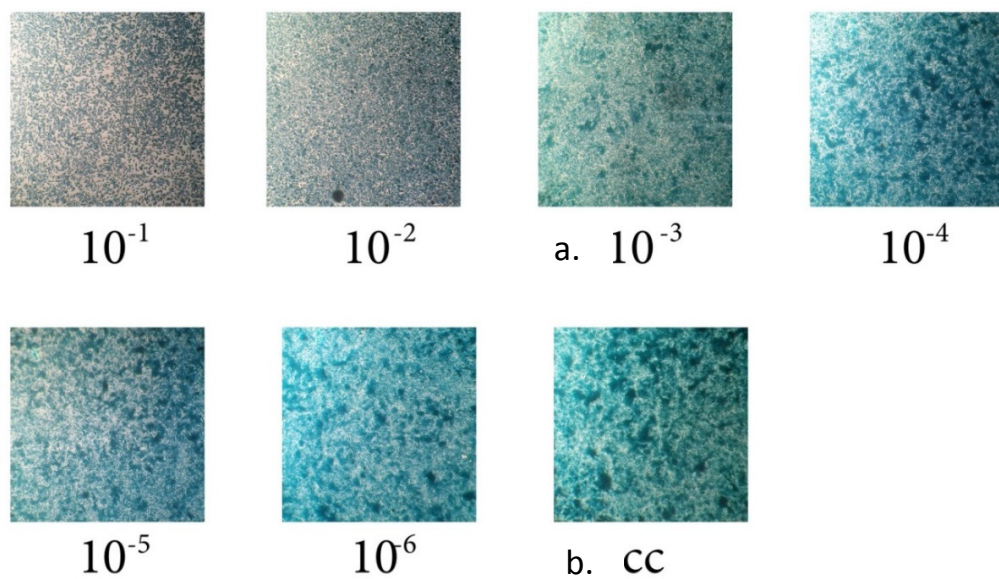


Figura 15: Vista microscópica de la prueba de plaqueo para DENV-2 realizado en placa de 96 pozos mediante el método de suspensión celular de Vero-76.

- a. La dilución 10^{-3} presenta una monocapa celular al 50% de confluencia.
- b. El control de células (CC) presenta una monocapa celular al 100% de confluencia.

NOTA: Desde la Figura 13 hasta la figura 15, se evaluaron las titulaciones en placas de 96 pozos. Desde la figura 16 hasta la figura 21 se consideró la periferia de las placas.

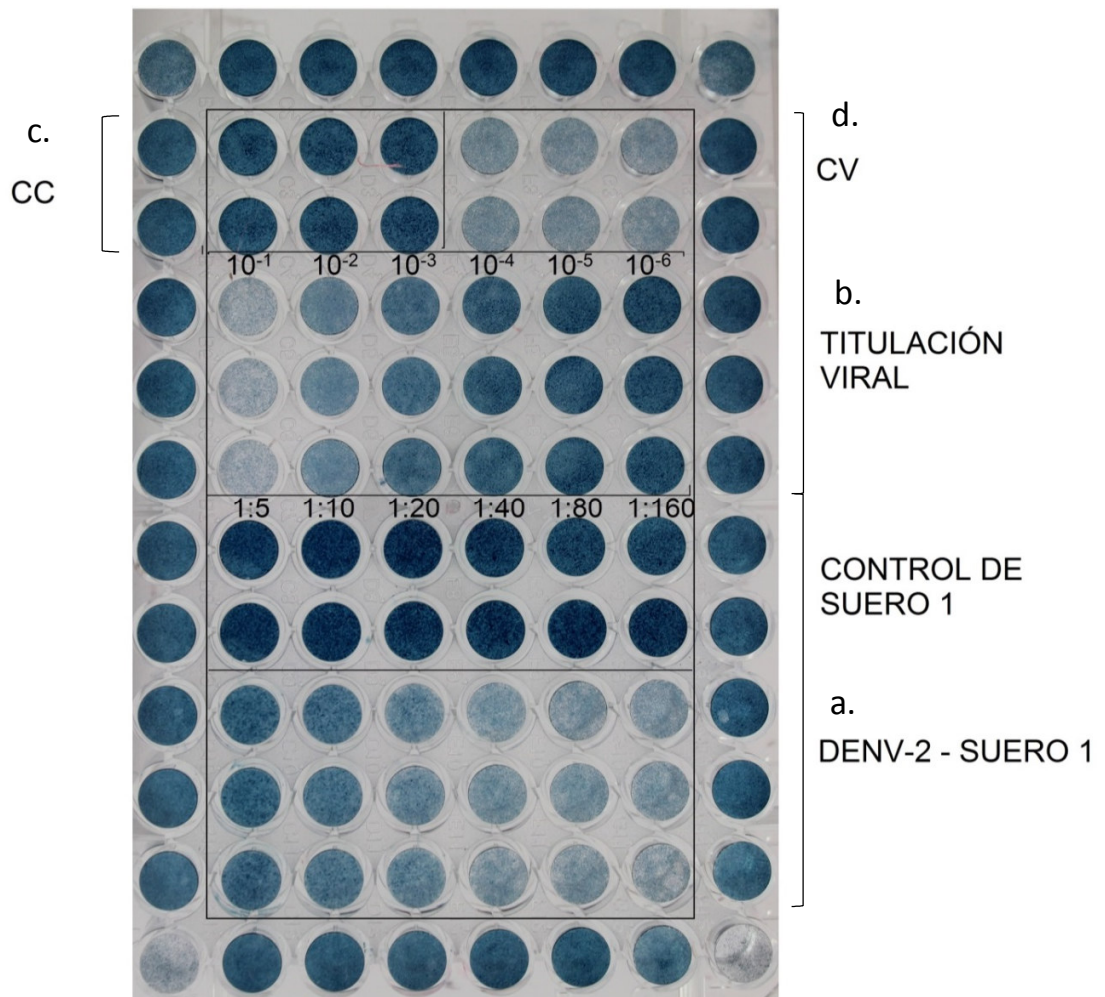


Figura 16: Evaluación del suero 1 mediante la prueba de microneutralización para DENV-2 empleando células Vero-76, junto a los controles de sueros.

- a. Suero 1: seronegativo a DENV-2 y YFV (dilución 1: 10).
- b. Control de la titulación viral
- c. Control de células (CC)
- d. Control de virus (CV)

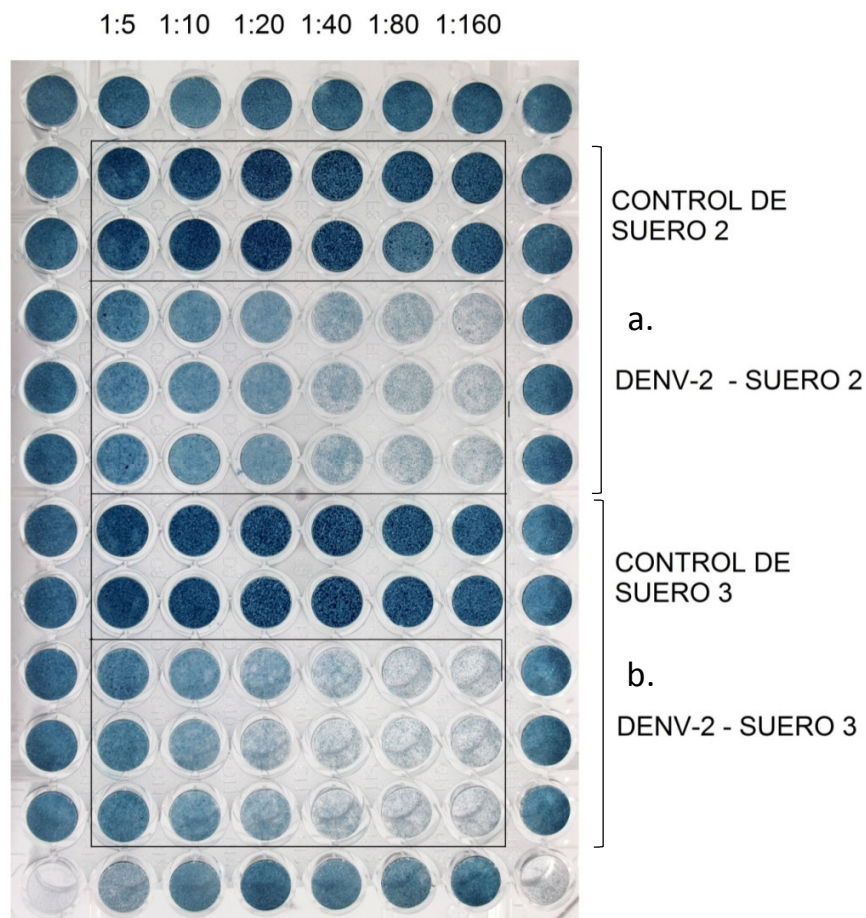


Figura 17: Evaluación del suero 2 y 3 mediante la prueba de microneutralización para DENV-2 empleando células Vero-76, junto a los controles de sueros.

- a. Suero 2: seronegativo a DENV-2 y YFV (dilución 1: 10).
- b. Suero 3: seronegativo a DENV-2 y YFV (dilución 1: 10).

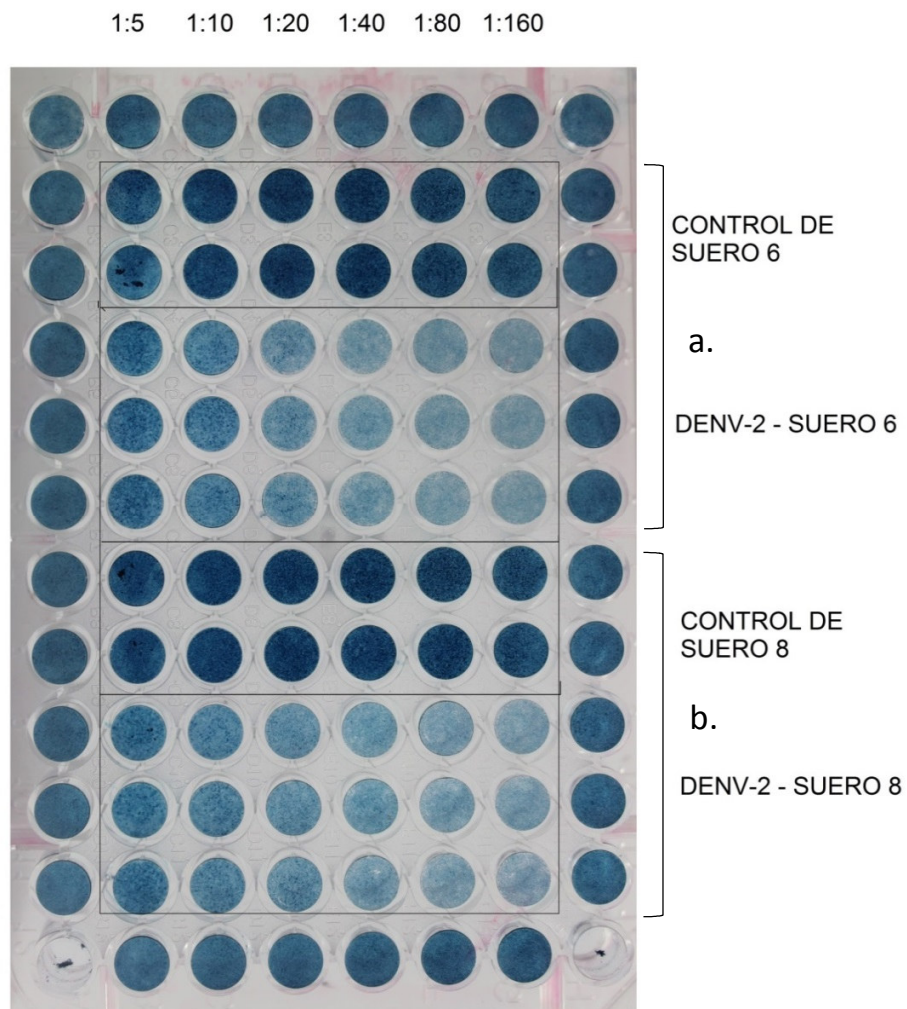


Figura 18: Evaluación del suero 6 y 8 mediante la prueba de microneutralización para DENV-2 empleando células Vero-76, junto a los controles de sueros.

- a. Suero 6: seronegativo a DENV-2 y seropositivo a YFV (dilución 1: 20).
- b. Suero 8: seronegativo a DENV-2 y seropositivo a YFV (dilución 1: 10).

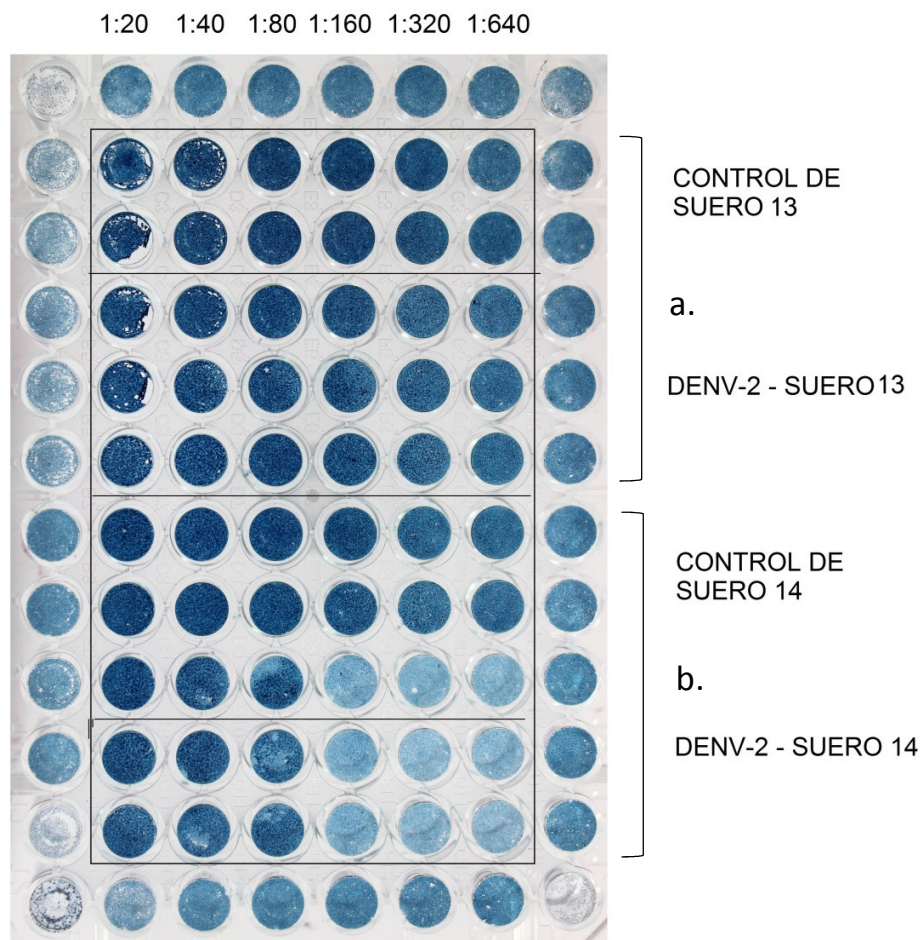


Figura 19: Evaluación del suero 13 y 14 mediante la prueba de microneutralización para DENV-2 empleando células Vero-76, junto a los controles de sueros.

- a. Suero 13: seropositivo a DENV-2 y YFV (dilución 1: 640).
- b. Suero 14: seropositivo a DENV-2 y YFV (dilución 1: 320).

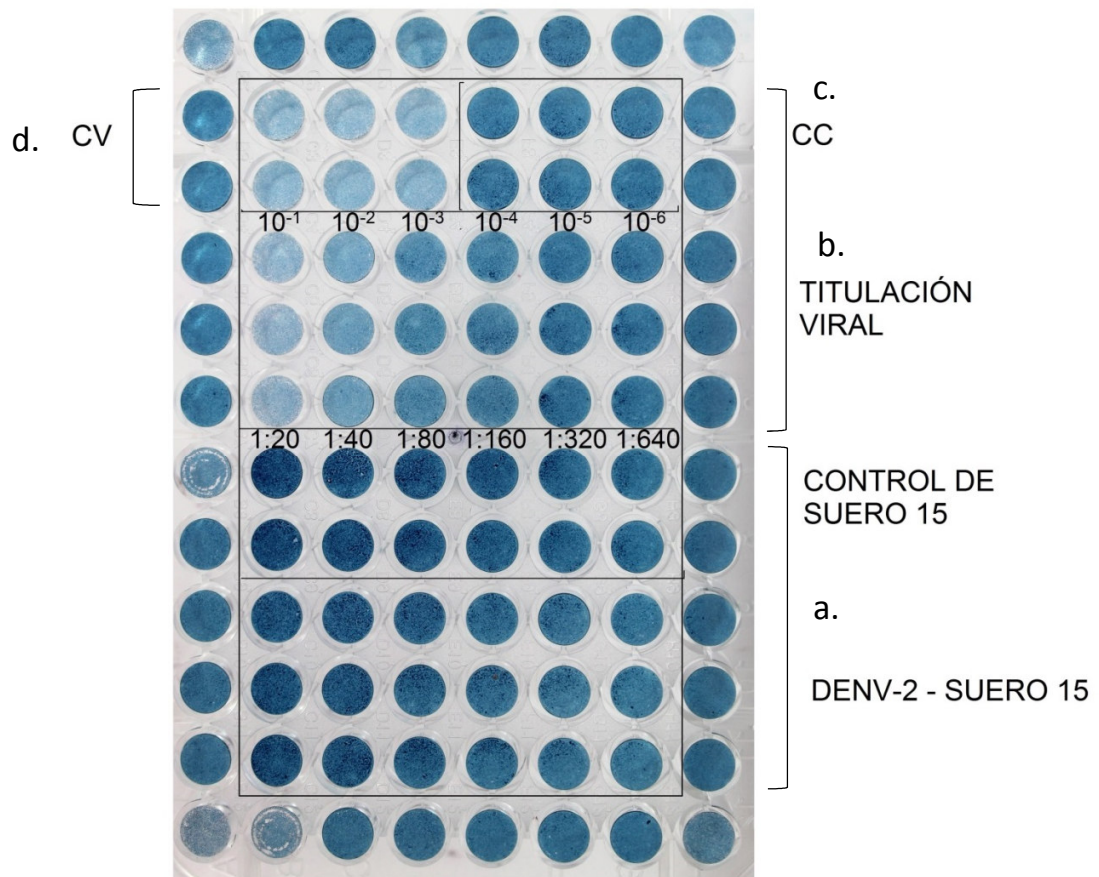


Figura 20: Evaluación del suero 15 mediante la prueba de microneutralización para DENV-2 empleando células Vero-76, junto a los controles de sueros.

- a. Suero 15: seropositivo a DENV-2 y YFV (dilución 1: 640).
- b. Control de la titulación viral
- c. Control de células (CC)
- d. Control de virus (CV)

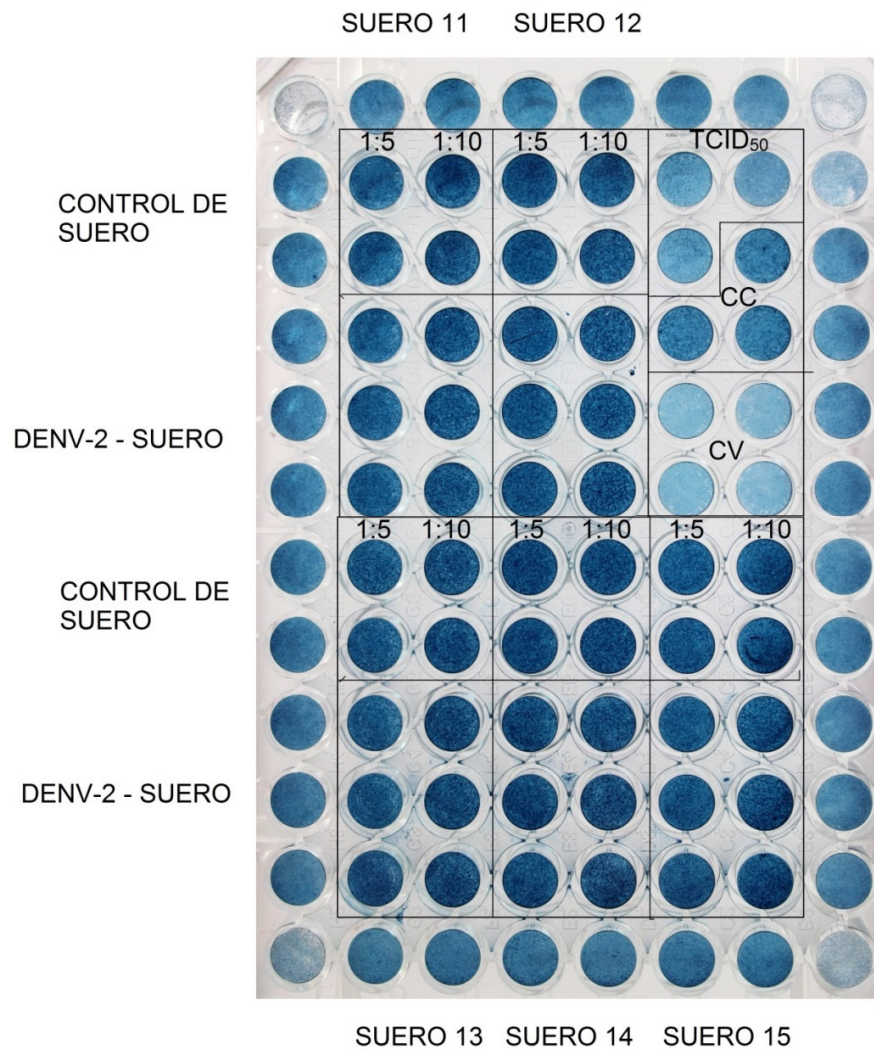


Figura 21: Evaluación de los sueros 11, 12, 13, 14 y 15: seropositivo a DENV-2 y YFV en las diluciones 1:5 y 1:10 mediante la prueba de microneutralización junto a sus controles de suero.

VIII. CONCLUSIONES

- La prueba de microneutralización para DENV-2 es una prueba semicuantitativa con alta sensibilidad y especificidad. Su optimización permitirá realizar estudios más exactos de seroprevalencia para dengue lo cual contribuirá a una eficaz vigilancia epidemiológica en el Perú.
- La adaptación de la semilla viral a la línea celular Vero-76 mediante pasajes sucesivos permitió un mejor efecto citopático para optimizar la prueba de microneutralización para DENV-2.
- La concentración óptima de células Vero-76 para la prueba de microneutralización fue $0,9 \times 10^5$ cel/mL propagándose con medio de mantenimiento al 2% SBF.
- La $TCID_{50}$ del *stock* de la semilla de DENV-2 para la prueba de microneutralización fue $10^{-3,48}$.
- El día óptimo de coloración de la prueba de microneutralización para DENV-2 fue al décimo día.
- Los 15 sueros evaluados en la prueba de microneutralización para DENV-2 no fueron citotóxicos a las células Vero-76 desde la dilución 1:5 hasta 1:640, siendo importante para evitar falsos positivos por desprendimiento celular causado por toxicidad de suero y no por efecto citopático del DENV-2.
- La mínima dilución capaz de diferenciar un suero seropositivo a DENV-2 de un suero seronegativo a DENV-2 mediante la prueba de microneutralización para DENV-2 fue 1:40.
- La correlación de los títulos de las 15 muestras séricas tanto por PRNT para DENV-2 y MNT para DENV-2 es estadísticamente significativa.

- Se redujo la concentración de células Vero-76 en un 64%, se redujo el consumo de insumos en la preparación de medios (principalmente por SBF) en un 83% y se redujo el tiempo de desarrollo del ensayo a 5 horas con respecto a la PRNT para DENV-2.

IX. RECOMENDACIONES

- La prueba de microneutralización para DENV-2 optimizada se deberá emplear en futuras investigaciones para evaluar la efectividad de la prueba en estudios de seroprevalencia para dengue.
- Para mejorar la optimización de MNT para DENV-2, es necesario realizar evaluaciones de reacciones cruzadas con el ZIKV en donde ambos virus circulan.
- Se recomienda realizar la Validación de la prueba de microneutralización para DENV-2.
- Se recomienda optimizar la prueba de microneutralización para los otros serotipos de DENV.
- Se recomienda determinar el genotipo de la cepa de DENV-2 mediante secuenciamiento genético.

X. ANEXOS

ANEXO 1: Soluciones preparadas para la PRNT para DENV-2 y la MNT para DENV-2 Carboximetilcelulosa al 6% (CMC)

CMC (SIGMA)..... 6 g

Agua destilada estéril100 mL

Mezclar en un frasco estéril con ayuda de un magneto, autoclavar, conservar en refrigeración hasta su uso.

Medio de crecimiento al 10% de SBF

Medio Mínimo Esencial con sales de Earle (GIBCO)	9,5 g/L
Aminoácidos No Esenciales 100 X (GIBCO)	1%
Aminoácidos No Esenciales 100 X (GIBCO)	1%
L-Glutamina 100 X (GIBCO)	1%
Antibiótico y Antimicótico 100 X (GIBCO)	1%
Suero Bovino Fetal (GIBCO)	10%
Bicarbonato de sodio al 8%	
HEPES (CDH)	25 mM
Agua bidestilada	Completar a 1 L

Ajustar con NaHCO_3 el medio de crecimiento a un pH: 7,4 y luego adicionar 25 mM de Hepes. Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm y almacenar a 4°C

Medio de mantenimiento al 2% SBF

Medio Mínimo Esencial con sales de Earle (GIBCO)	9,5 g/L
Aminoácidos No Esenciales 100 X (GIBCO)	1%
Piruvato de sodio 100 X (GIBCO)	1%
L-Glutamina 100 X (GIBCO)	1%
Antibiótico y Antimicótico 100 X (GIBCO)	1%
Suero Bovino Fetal (GIBCO)	2%
Bicarbonato de sodio al 8%	
HEPES (CDH)	25 mM
Agua bidestilada	Completar a 1 L

Ajustar con NaHCO_3 el medio de crecimiento a un pH: 7,4 y luego adicionar 25 mM de Hepes. Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm y almacenar a 4°C.

Medio de mantenimiento al 3% SBF

Medio Mínimo Esencial con sales de Earle (E-MEM) (GIBCO)	9,5 g/L
Aminoácidos No Esenciales 100 X (GIBCO)	1%
Piruvato de sodio (GIBCO)	1%
L-Glutamina 100 X (GIBCO)	1%
Antibiótico y Antimicótico 100 X (GIBCO)	1%
Suero Bovino Fetal (GIBCO)	3%
Bicarbonato de sodio al 8%	
HEPES (CDH)	25 Mm
Agua bidestilada	Completar a 1 L

Ajustar con NaHCO_3 el medio de crecimiento a un pH: 7,4 y luego adicionar 25 mM de Hepes. Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm y almacenar a 4°C

Medio de mantenimiento al 4%SBF

Medio Mínimo Esencial con sales de Earle (GIBCO)	9,5 g/L
Piruvato de sodio (GIBCO)	1%
Aminoácidos No Esenciales 100 X (GIBCO)	1%
L-Glutamina 100 X (GIBCO)	1%
Antibiótico y Antimicótico 100 X (GIBCO)	1%
Suero Bovino Fetal (GIBCO)	4%
Bicarbonato de sodio al 8%	
HEPES (CDH)	25 mM
Agua bidestilada	Completar a 1 L

Ajustar con NaHCO_3 el medio de crecimiento a un pH: 7,4 y luego adicionar 25 mM de Hepes. Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 μm y almacenar a 4°C

Medio de recubrimiento

Medio E-MEM 2 X

Medio Mínimo Esencial con sales de Earle (E-MEM) (GIBCO)	19 g/L
Piruvato de sodio (GIBCO)	2%
Aminoácidos No Esenciales 100 X (GIBCO)	2%
L-Glutamina 100 X (GIBCO)	1%
Antibiótico y Antimicótico 100 X (GIBCO)	2%
Suero Bovino Fetal (GIBCO)	10%
Bicarbonato de sodio al 8%	
HEPES (CDH)	25 mM
Agua bidestilada	Completar a 1 L

Se mezcla el Medio E-MEM 2 X ajustado a pH: 7,4 con CMC al 6% en la relación 11: 5 y luego se adiciona Hepes. Finalmente dejar incubar el medio CMC a 37°C durante 24 horas.

Colorante Azul negro de Naftol

Azul negro de Naftol (SIGMA)	2 g
Acetato de sodio	13,6 g
Ácido acético glacial	60 mL
Agua destilada	Completar a 1L

No es necesario esterilizar, se puede almacenar por periodos largos a temperatura ambiental.

Tripsina

Tripsina (SIGMA)	0,48 g
Agua destilada	100 mL

Esterilizar por filtración con membrana de 0,22 µm y almacenar a congelación hasta su uso.

ANEXO 2: Conteo celular de Vero-76

OBJETIVO

- Realizar el recuento de células para observar la viabilidad celular y la concentración celular.

MATERIALES

- Azul de tripan (0,5% en solución salina)

EQUIPOS

- Cámara de flujo laminar
- Microscopio invertido
- Cámara de Neubauer
- Vortex
- Micropipetas de 20 ul a 200 ul de capacidad con puntas estériles.

PROCEDIMIENTO

1. Se realiza el desprendimiento de la monocapa celular con tripsina.
2. Se realiza el conteo celular mezclando 100 ul de suspensión celular y 100 μ L de colorante de azul de tripan (0,5% en solución salina).
3. Dispensar 100 ul de la mezcla en los compartimientos de la cámara de Neubauer.
4. Realizar el conteo de células de cada uno de los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer.
5. Calcular el promedio de células de los cuatro cuadrantes.
6. Calcular la concentración de la suspensión celular con la fórmula siguiente:

Promedio de células	x	factor de dilución	x	Factor de conversión de la cámara de Neubauer
------------------------	---	-----------------------	---	--

Factor de dilución : 2

Factor de conversión : 10 000

7. Finalmente, para obtener la concentración celular usada para la PRNT Y MNT se emplea la formula siguiente:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

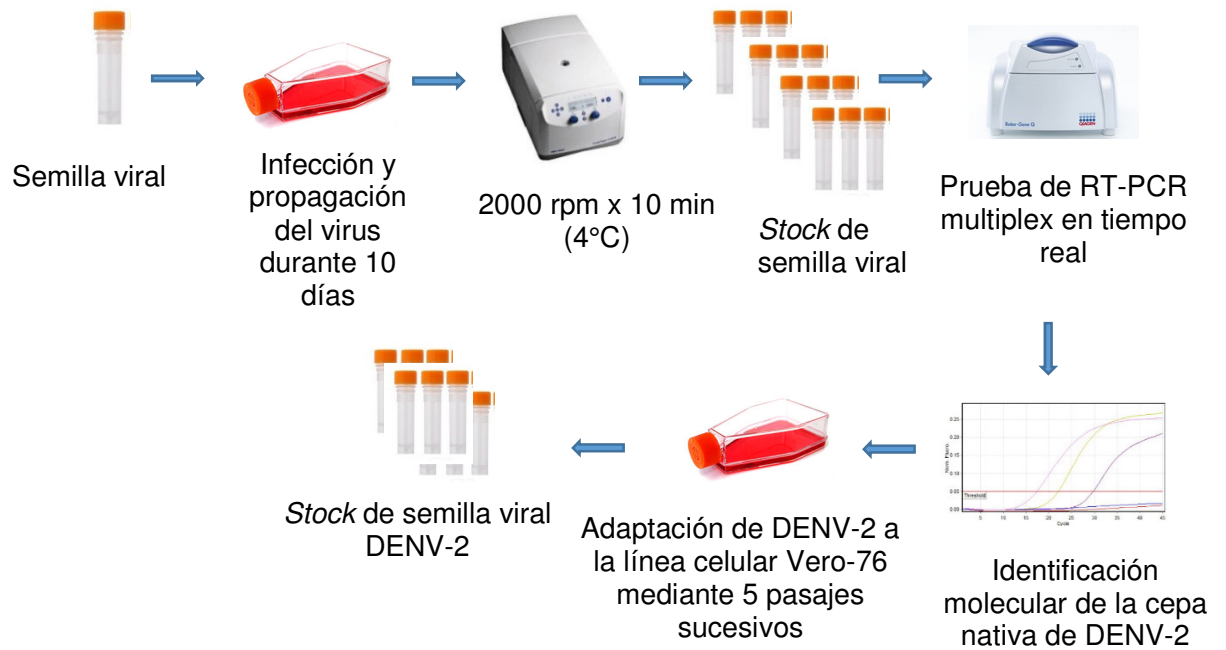
ANEXO 3: PRNT para anticuerpos neutralizantes contra YFV

1. Se preparó una dilución viral que contenga un aproximado de 15-20 UFP/50 µl para la PRNT. Para esto se preparó una suspensión viral de 30 UFP/50 µl.
2. Se analizó las 15 muestras séricas empleadas para la MNT para DENV-2 con la finalidad de confirmar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes contra YFV, las cuales 5 sueros son procedentes de pacientes de Lima y sin antecedentes de vacunación para fiebre amarilla, 5 sueros son procedentes de pacientes con antecedentes de vacunación para fiebre amarilla de Lima y 5 sueros son procedentes de pacientes de Madre de Dios. Para ello, las muestras séricas se inactivaron a 56°C por 30 minutos.
3. Seguidamente se preparó los sueros a una dilución final de 1:10.
4. Una vez obtenida la suspensión viral en una concentración de 30 UFP/50 µl y las diluciones de los sueros, se realizó la mezcla YFV –suero y se incubó a 37°C por una hora en condiciones herméticas.
5. Se inoculó 50 µl de la mezcla virus-suero por duplicado para cada muestra en placas de 24 pozos con monocapa celular preformada de células Vero-76. Además, se establecieron 2 pozos de control de células, 2 pozos de control de virus.
6. Las placas se sellaron herméticamente y se incubaron a 37° C por 3 horas.
7. Se adicionó 500 µl /pozo de medio de recubrimiento (3%CMC) a las placas.
8. Las placas se incubaron a 37° C en condiciones herméticas hasta el día de coloración.
9. Las placas se colorearon con 400 µl de Azul Negro de Naftol y se dejó reposando hasta el día siguiente a temperatura ambiente.
10. Se realizó la lectura y cálculos.

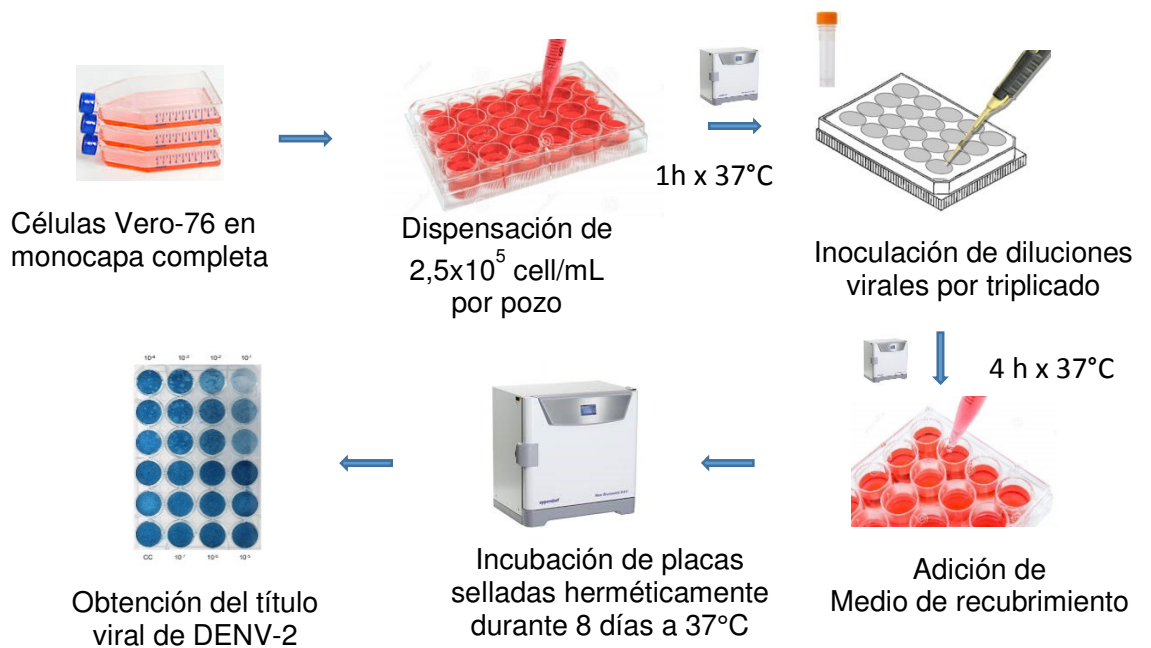
- a. Se calculó el promedio del número de placas en el control de virus.
- b. Se calculó el porcentaje de reducción de placas para cada mezcla virus - suero en relación al promedio de control de virus. Cuando el porcentaje de reducción es mayor al 70% se considera que el suero problema es positivo.

ANEXO 4: Flujograma

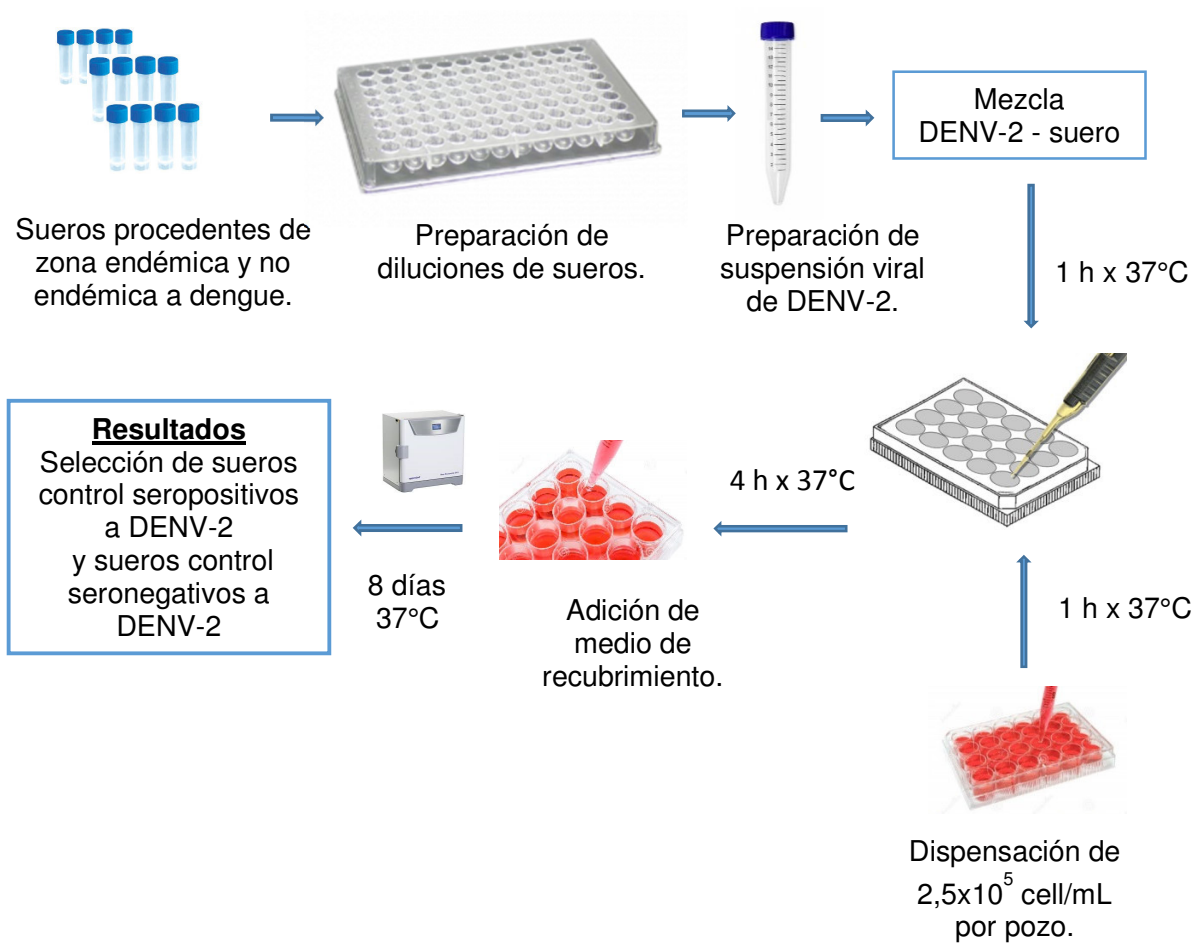
1) Adaptación de la semilla viral de la cepa nativa DENV-2



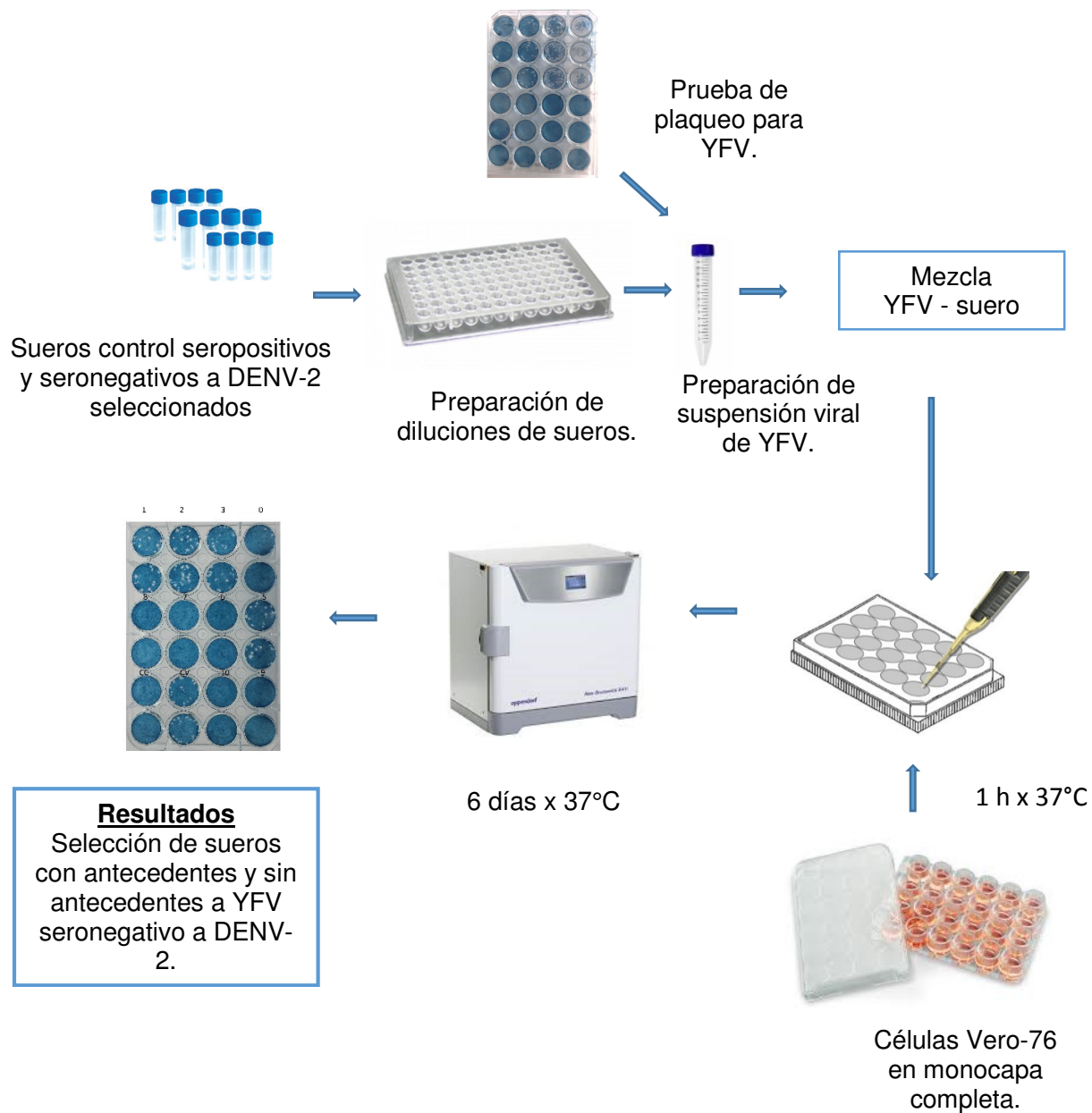
2) Prueba de plaqueo para DENV-2



3) Selección de sueros control mediante la PRNT para DENV-2

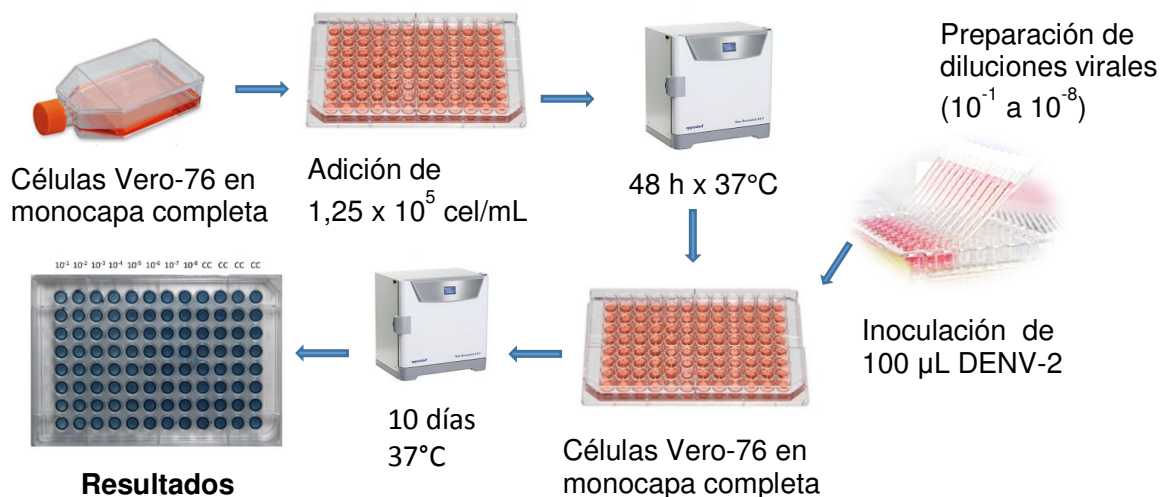


4) Detección de anticuerpos neutralizantes contra YFV mediante la PRNT de los sueros control seleccionados

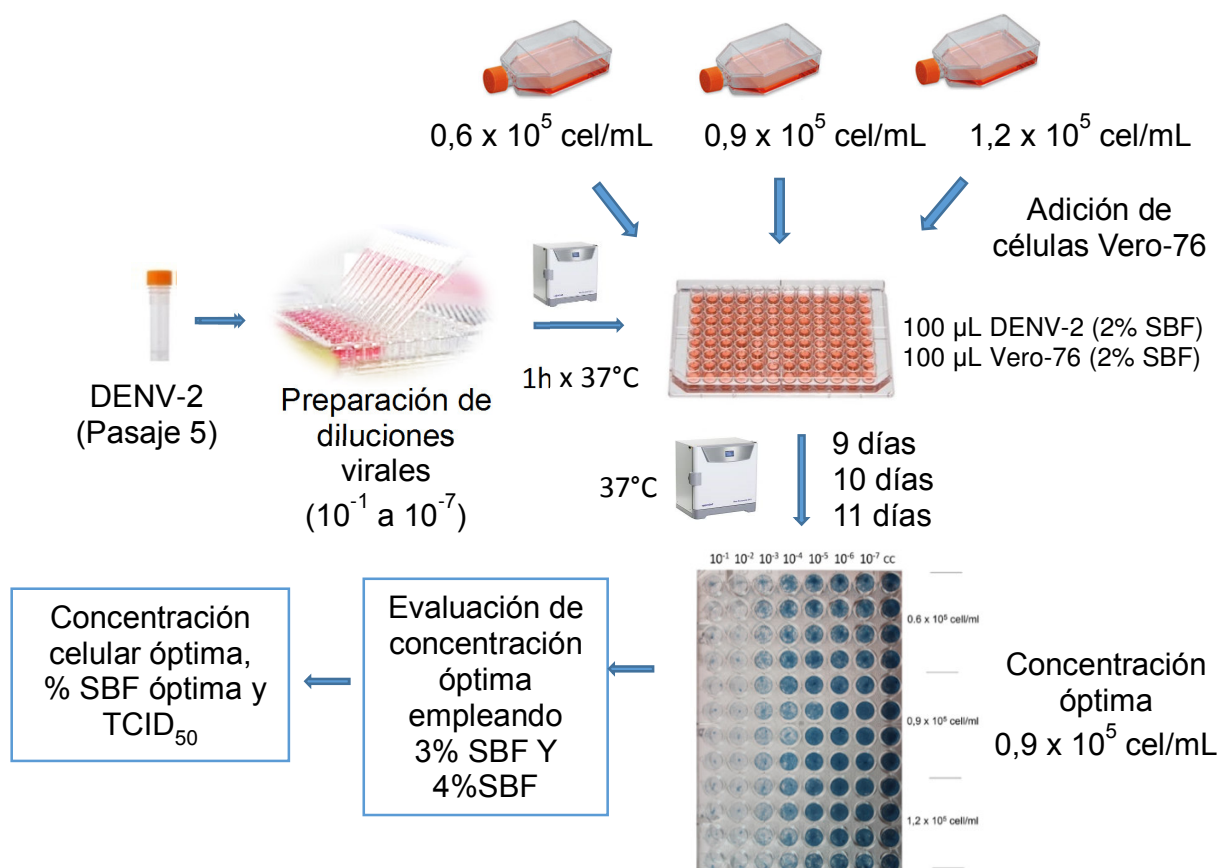


5) Optimización de la prueba de microneutralización para DENV-2

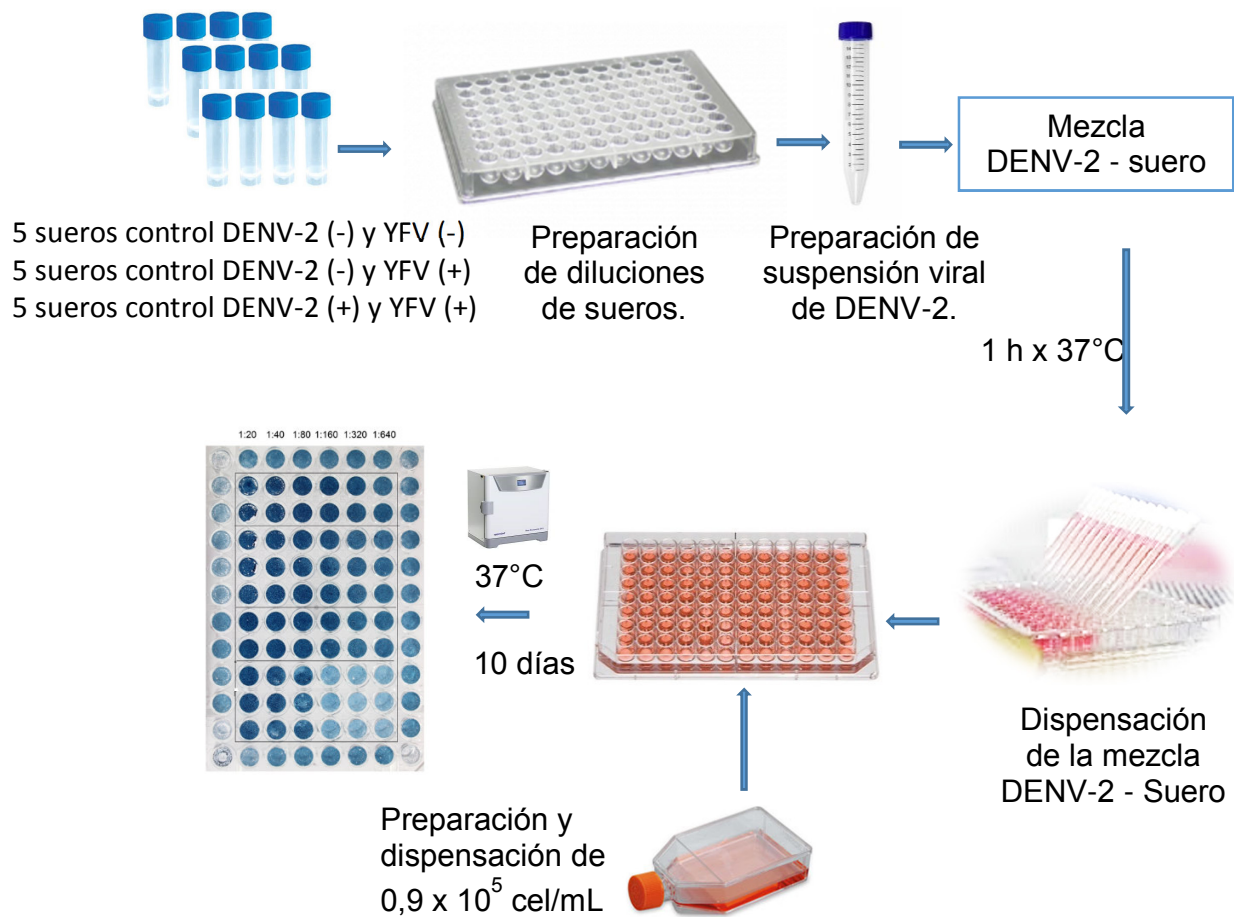
5.1) Prueba de plaqueo para DENV-2 por el método de monocapa completa



5.2) Prueba de plaqueo para DENV-2 por el método de suspensión celular



5.3) Prueba de microneutralización para DENV-2



6) Evaluación de los resultados de los sueros analizados mediante la PRNT y prueba de microneutralización para la detección de anticuerpos neutralizantes contra DENV-2

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-BAS, Carmen; GÓMEZ-CORDERO, Ivonne. Biología y métodos diagnósticos del dengue. Revista Biomédica, 2005, vol. 16, no 2, p. 113-138.
- AGARWAL, R., WAHID, M.H., YAUSEP, O.E., ANGEL, S.H. y LOKESWARA, A.W., 2017. The Immunogenicity and Safety of CYD-Tetravalent Dengue Vaccine (CYD-TDV) in Children and Adolescents: A Systematic Review. Acta Medica Indonesiana, vol. 49, no. 1, pp. 24-33. ISSN 0125-9326.
- ALTHOUSE, B.M., DURBIN, A.P., HANLEY, K.A., HALSTEAD, S.B., WEAVER, S.C. y CUMMINGS, D.A.T., 2014. Viral kinetics of primary dengue virus infection in non-human primates: a systematic review and individual pooled analysis. Virology, vol. 452-453, pp. 237-246. ISSN 1096-0341. DOI 10.1016/j.virol.2014.01.015.
- ALVAREZ, M., GONZÁLEZ, A., DÍAZ, D., MORIER, L., GUZMÁN, M., 2010. Normalización de la técnica de neutralización por placas en las células Vero para los virus del dengue. Rev Cubana Med Trop [online]., vol.62, n.2 [citado 2017-08-02], pp. 138-137 . ISSN 1561-3054.
- ALVAREZ, V., VALDÉZ, P., VÁSQUEZ, R.S., DELGADO, H.I., GARCÍA, I.S., MORIER, D.L., GUZMÁN, M.G, 1998. Normalización de la técnica de reducción de placas para diferenciar una infección por Dengue de una infección por Fiebre Amarilla. Rev Cub Med Trop 1998; 50(3): 177-81.
- ARIAS P.J. 2011. Análisis de la respuesta inmunitaria inflamatoria en la infección por el virus dengue y su significancia. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá.
- BAER, A. y KEHN-HALL, K., 2014. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. Journal of

Visualized Experiments : JoVE [en línea], no. 93. [Consulta: 2 agosto 2017]. ISSN 1940-087X. DOI 10.3791/52065.

- BARRETO L.Y. 2008. Seroprevalencia del virus Guaroa en pobladores de las localidades de Madre de Dios, Yurimaguas, Chanchamayo e Iquitos. Tesis, Título Profesional de Biólogo, Mención Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. EAP de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- BEAN, A.G.D., BAKER, M.L., STEWART, C.R., COWLED, C., DEFFRASNES, C., WANG, L.-F. y LOWENTHAL, J.W., 2013. Studying immunity to zoonotic diseases in the natural host [mdash] keeping it real. *Nature Reviews Immunology*, vol. 13, no. 12, pp. 851-861. ISSN 1474-1733. DOI 10.1038/nri3551.
- BONA, A. C. D.; TWERDOCHLIB, A. L., NAVARRO, M. A., 2012. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Paraná, Brazil, based on a fragment of the capsid/premembrane junction region. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online].vol.45, n.3 [cited 2017-08-16], pp.297-300. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822012000300003&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0037-8682.
- BUDDHARI, D., ALDSTADT, J., ENDY, T. P., SRIKIATKHACHORN, A., THAISOMBOONSUK, B., KLUNGTHONG, C., NISALAK, A., KHUNTIRAT, B., JARMAN, R. G., FERNANDEZ, S., THOMAS, S. J., SCOTT, T. W., ROTHMAN, A. L., YOON, I .K., 2014. Dengue virus neutralizing antibody levels associated with protection from infection in thai cluster studies. *PLoS neglected tropical diseases*, vol. 8, no 10, p. e3230.
- CABEZAS C., FIESTAS V., GARCÍA, M., PALOMINO M., MAMANI E., DONAIRES F., 2015. Dengue en el Perú: a un cuarto de siglo de su reemergencia. *Rev Perú*

- Med Exp Salud Publica [online]., vol.32, n.1 [cited 2016-03-22], pp. 146-156 .
46342015000100021&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1726-4634.
- CABEZAS, C., GARCÍA, M.P., VALLE, J., YAÑEZ, P., FACHIN, L., SINTI, C., MAMANI, E., 2015. Transmisión vertical del virus del dengue en el *Aedes aegypti*, Perú. Rev. Perú. med. exp. salud pública [online]. vol.32, n.1 [citado 2017-08-01], pp. 191-192. ISSN 1726-4634.
 - CAMACHO, D., BRACHO, M., RODRIGUEZ F., MORIER, L., GUZMAN, M. G., COMACH G.A., 2009. Propiedades biológicas de cepas venezolanas de DENV-2 aisladas de pacientes con fiebre de dengue y fiebre hemorrágica del dengue. Rev Cubana Med Trop [online]., vol.61, n.3 [citado 2017-08-01], pp. 259-268 . Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602009000300010&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1561-3054
 - CDC. 2016. Dengue: Entomology and ecology. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/index.html>
 - CDC. 2016. Laboratory Guidance and Diagnostic Testing. Dengue. Disponible en:<http://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/laboratory.html>
 - CHOQUE F., HUAMANI F., CANELO C., 2016. Síntomas crónicos tras episodio de dengue, una necesidad de investigación. Rev. Perú. med. exp. salud pública [online]. vol.33, n.1 [citado 2016-06-23], pp. 181-182. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342016000100029&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1726-4634.
 - DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGIA, MINISTERIO DE SALUD, 2015. Directivas sanitarias para la vigilancia epidemiológica y diagnóstico de laboratorio de la fiebre de Chikungunya en el Perú y para la vigilancia epidemiológica de dengue. Lima: Ministerio de Salud del Perú [en línea], [Consulta: 15 septiembre

2017]. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/normas/2014/DS057-2014.pdf>

- DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGIA, MINISTERIO DE SALUD, 2016. Situación del dengue en el Perú (a la SE 21); Boletín epidemiológico Volumen 25 (8): 133 – 138.,
- DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGIA, MINISTERIO DE SALUD, 2017. Situación del dengue en el Perú (a la SE 21); Boletín epidemiológico Volumen 26 (8): 688 – 691.,
- DURÁN, C.; LANZA, T.; PLATA, J. Fisiopatología y diagnóstico del dengue. Rev Med Hondur, 2010, vol. 78, no 3, p. 136-41.
- EL-KAFRAWY, S.A., SOHRAB, S.S., ELA, S.A., ABD-ALLA, A.M.M., ALHABBAB, R., FARRAJ, S.A., OTHMAN, N.A., HASSAN, A.M., BERGOIN, M., KLITTING, R., CHARREL, R.N., HASHEM, A.M., MADANI, T.A. y AZHAR, E.I., 2016. Multiple Introductions of Dengue 2 Virus Strains into Saudi Arabia from 1992 to 2014. Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.), vol. 16, no. 6, pp. 391-399. ISSN 1557-7759. DOI 10.1089/vbz.2015.1911.
- ESCOBAR, L.M., MORAANTES, S., CORDERO, C.P. y ARISTIZABAL, F., 2011. Implementación de estrategias in vitro para evaluar la funcionalidad de un suero fetal bovino colombiano. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, vol. 40, no. 2, pp. 201-221. ISSN 1909-6356.
- FAJARDO R.A. 2011. Variabilidad Genética del virus Dengue en la región sudamericana: Primeros abordajes epidemiológicos frente a una eventual reemergencia del virus Dengue en el Uruguay. Tesis de Maestría. Centro de investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias. Universidad de la República.

- FORSHEY, B.M., REINER, R.C., OLKOWSKI, S., MORRISON, A.C., ESPINOZA, A., LONG, K.C., VILCARROMERO, S., CASANOVA, W., WEARING, H.J., HALSEY, E.S., KOCHER, T.J., SCOTT, T.W. y STODDARD, S.T., 2016. Incomplete Protection against Dengue Virus Type 2 Re-infection in Peru. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 10, no. 2, pp. e0004398. ISSN 1935-2735. DOI 10.1371/journal.pntd.0004398.
- GUABIRABA, R. y RYFFEL, B., 2014. Dengue virus infection: current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. *Immunology*, vol. 141, no. 2, pp. 143-156. ISSN 1365-2567. DOI 10.1111/imm.12188.
- GUZMAN, M.G. y VAZQUEZ, S., 2010. The Complexity of Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. *Viruses*, vol. 2, no. 12, pp. 2649-2662. ISSN 1999-4915. DOI 10.3390/v2122649.
- HUAMAN J.L. 2008. Inmunoserología de la presencia del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) en poblaciones humanas de Iquitos, Yurimaguas y Cusco. Tesis, Título Profesional de Biólogo, Mención Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. EAP de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- HUANG, X., YUE, Y., LI, D., ZHAO, Y., QIU, L., CHEN, J., PAN, Y., XI, J., WANG, X., SUN, Q. y LI, Q., 2016. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection inhibits RLR-mediated Type-I IFN-independent signalling through upregulation of cellular autophagy. *Scientific Reports*, vol. 6, pp. 22303. ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/srep22303.
- IDRIS, A. N., BABA M. M. , THAIRU Y. , BAMIDELE O. 2013. Sero-prevalence of dengue type-3 Virus among patients with febrile illnesses attending a tertiary hospital in Maiduguri, Nigeria. *International Journal*, , vol. 5, no 12, p. 560-563

- JUAREZ D.S. 2009. Detección de anticuerpos neutralizantes contra los virus Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo en una población humana de Iquitos entre los años 2003-2007. Tesis, título profesional de biólogo, Mención Biología Celular y Genética. Facultad de Ciencias Biológicas. EAP de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- JUNJHON, J., PENNINGTON, J.G., EDWARDS, T.J., PERERA, R., LANMAN, J. y KUHN, R.J., 2014. Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. *Journal of Virology*, vol. 88, no. 9, pp. 4687-4697. ISSN 1098-5514. DOI 10.1128/JVI.00118-14.
- KRAEMER, M.U., SINKA, M.E., DUDA, K.A., MYLNE, A.Q., SHEARER, F.M., BARKER, C.M., MOORE, C.G., CARVALHO, R.G., COELHO, G.E., BORTEL, W.V., HENDRICKX, G., SCHAFFNER, F., ELYAZAR, I.R., TENG, H.-J., BRADY, O.J., MESSINA, J.P., PIGOTT, D.M., SCOTT, T.W., SMITH, D.L., WINT, G.W., GOLDING, N. y HAY, S.I., 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife*, vol. 4, pp. e08347. ISSN 2050-084X. DOI 10.7554/eLife.08347.
- LI, J., HU, D., DING, X., CHEN, Y., PAN, Y., QIU, L. y CHE, X., 2011. Enzyme-linked immunosorbent assay-format tissue culture infectious dose-50 test for titrating dengue virus. *PloS One*, vol. 6, no. 7, pp. e22553. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0022553.
- LIU, C.-C. y WU, S.-C., 2004. Mosquito and mammalian cells grown on microcarriers for four-serotype dengue virus production: variations in virus titer, plaque morphology, and replication rate. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 85, no. 5, pp. 482-488. ISSN 0006-3592. DOI 10.1002/bit.10918.

- LOGAN, N., MCMONAGLE, E., DREW, A.A., TAKAHASHI, E., MCDONALD, M., BARON, M.D., GILBERT, M., CLEAVELAND, S., HAYDON, D.T., HOSIE, M.J. y WILLETT, B.J., 2016. Efficient generation of vesicular stomatitis virus (VSV)-pseudotypes bearing morbilliviral glycoproteins and their use in quantifying virus neutralising antibodies. *Vaccine*, vol. 34, no. 6, pp. 814-822. ISSN 1873-2518. DOI 10.1016/j.vaccine.2015.12.006.
- MAMANI E.Z. 2013. Identificación de genotipos y linajes de los cuatro serotipos del virus dengue en el Perú durante los años 1998-2012. Tesis. Grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- MARTINA, B.E.E., KORAKA, P. y OSTERHAUS, A.D.M.E., 2009. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 22, no. 4, pp. 564-581. ISSN 0893-8512, 1098-6618. DOI 10.1128/CMR.00035-09.
- MEDINA F., MEDINA J.F., COLON C., VERGNE E., SANTIAGO G.A., MUNOZ J.L. 2012. Dengue virus: isolation, propagation, quantification, and storage. *Current protocols in microbiology*. Chapter 15:Unit 15D 2. ISSN :2318-4594.
- MUSTAFA, M.S., RASOTGI, V., JAIN, S. y GUPTA, V., 2015. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal, Armed Forces India*, vol. 71, no. 1, pp. 67-70. ISSN 0377-1237. DOI 10.1016/j.mjafi.2014.09.011.
- PIZARRO, Daniel. Dengue, Dengue hemorrágico. *Acta pediátr. costarric* [online]. 2009, vol.21, n.1 [cited 2017-08-01], pp. 08-17. Available from: <http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00902009000100002&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1409-0090.

- PUJOL, M. y LIMÓN, E. 2013. Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, pp. 108-113. ISSN 0213-005X. DOI 10.1016/j.eimc.2013.01.001.
- PUTNAK, J.R., DE LA BARRERA, R., BURGESS, T., PARDO, J., DESSY, F., GHEYSEN, D., LOBET, Y., GREEN, S., ENDY, T.P., THOMAS, S.J., ECKELS, K.H., INNIS, B.L. y SUN, W., 2008. Comparative evaluation of three assays for measurement of dengue virus neutralizing antibodies. En: PMID: 18606774, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 79, no. 1, pp. 115-122. ISSN 1476-1645.
- REQUENA, E., MENDOZA, L. GUEVARA, M. 2016. Nuevas áreas de distribución de *Aedes aegypti* en Perú. Rev. Perú. med. exp. salud publica [online], vol.33, n.1 [citado 2017-08-01], pp. 171-172. ISSN 1726-4634.
- ROCKSTROH, A., BARZON, L., PACENTI, M., PALÙ, G., NIEDRIG, M. y ULBERT, S., 2015. Recombinant Envelope-Proteins with Mutations in the Conserved Fusion Loop Allow Specific Serological Diagnosis of Dengue-Infections. En: PMID: 26565964PMCID: PMC4643925, PLoS neglected tropical diseases, vol. 9, no. 11, pp. e0004218. ISSN 1935-2735. DOI 10.1371/journal.pntd.0004218.
- RODRIGUEZ R., LOPEZ, L., ALVAREZ, M., MORIER, L., GUZMAN, M. 2011. Propiedades biológicas de cepas de virus dengue serotipo 2 aisladas durante la epidemia en Santiago de Cuba, 1997. Rev Cubana Med Trop [online]. vol.63, n.3 [citado 2017-12-05], pp. 211-219. ISSN 0375-0760.
- ROEHRIG, J.T., HOMBACH, J. y BARRETT, A.D.T., 2008. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. En: PMID: 18476771, Viral Immunology, vol. 21, no. 2, pp. 123-132. ISSN 0882-8245. DOI 10.1089/vim.2008.0007

- RUIZ, F. GONZÁLES, A., VÉLEZ, A., GOMEZ, G., ZULETA, L., URIBE, S., VÉLEZ, D., 2016. Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus del dengue en alturas no registradas para Colombia. Biomédica [online]. vol.36, n.2 [citado 2017-08-01], pp.303-308. ISSN 0120-4157. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3301>.
- SALJE, H., RODRÍGUEZ-BARRAQUER, I., RAINWATER-LOVETT, K., NISALAK, A., THAISOMBOONSUK, B., THOMAS, S.J., FERNANDEZ, S., JARMAN, R.G., YOON, I.-K. y CUMMINGS, D.A.T., 2014. Variability in dengue titer estimates from plaque reduction neutralization tests poses a challenge to epidemiological studies and vaccine development. PLoS neglected tropical diseases, vol. 8, no. 6, pp. e2952. ISSN 1935-2735. DOI 10.1371/journal.pntd.0002952.
- SCREATON, G., MONGKOLSAPAYA, J., YACOUB, S. y ROBERTS, C., 2015. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. Nature Reviews. Immunology, vol. 15, no. 12, pp. 745-759. ISSN 1474-1741. DOI 10.1038/nri3916.
- THOMAS, S.J., NISALAK, A., ANDERSON, K.B., LIBRATY, D.H., KALAYANAROOJ, S., VAUGHN, D.W., PUTNAK, R., GIBBONS, R.V., JARMAN, R. y ENDY, T.P., 2009. Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary Dengue Virus Infections: How Alterations in Assay Conditions Impact Performance. En: PMID: 19861618PMCID: PMC2835862, The American journal of tropical medicine and hygiene, vol. 81, no. 5, pp. 825-833. ISSN 0002-9637. DOI 10.4269/ajtmh.2009.08-0625.
- TIMIRYASOVA, T.M., BONAPARTE, M.I., LUO, P., ZEDAR, R., HU, B.T. y HILDRETH, S.W., 2013. Optimization and validation of a plaque reduction neutralization test for the detection of neutralizing antibodies to four serotypes of dengue virus used in support of dengue vaccine development. En: PMID:

23458954PMCID: PMC3752766, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 88, no. 5, pp. 962-970. ISSN 1476-1645. DOI 10.4269/ajtmh.12-0461.

- VAIDYA, S.R., BROWN, D.W.G., JIN, L., SAMUEL, D., ANDREWS, N. y BROWN, K.E., 2010. Development of a focus reduction neutralization test (FRNT) for detection of mumps virus neutralizing antibodies. En: PMID: 19761798, Journal of Virological Methods, vol. 163, no. 1, pp. 153-156. ISSN 1879-0984. DOI 10.1016/j.jviromet.2009.09.006.
- VELANDIA, M.L. y CASTELLANOS, J.E., 2011. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. Infectio, vol. 15, no. 1, pp. 33-43. ISSN 0123-9392. DOI 10.1016/S0123-9392(11)70074-1.
- WAMAN, V.P., KALE, M.M. y KULKARNI-KALE, U., 2017. Genetic diversity and evolution of dengue virus serotype 3: A comparative genomics study. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, vol. 49, pp. 234-240. ISSN 1567-7257. DOI 10.1016/j.meegid.2017.01.022.
- WAMAN, V.P., KOLEKAR, P., RAMTIRTHKAR, M.R., KALE, M.M. y KULKARNI-KALE, U., 2016. Analysis of genotype diversity and evolution of Dengue virus serotype 2 using complete genomes. PeerJ, vol. 4, pp. e2326. ISSN 2167-8359. DOI 10.7717/peerj.2326.
- WILLIAMS, M., MAYER, S.V., JOHNSON, W.L., CHEN, R., VOLKOVA, E., VILCARROMERO, S., WIDEN, S.G., WOOD, T.G., SUAREZ-OGNIO, L., LONG, K.C., HANLEY, K.A., MORRISON, A.C., VASILAKIS, N. y HALSEY, E.S., 2014. Lineage II of Southeast Asian/American DENV-2 is Associated with a Severe Dengue Outbreak in the Peruvian Amazon. The American Journal of Tropical

Medicine and Hygiene, vol. 91, no. 3, pp. 611-620. ISSN 0002-9637,. DOI 10.4269/ajtmh.13-0600.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION, et al. 2016. Weekly Epidemiological Record, 23 September 2016, vol. 91, 39 (pp. 441–460).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organization,
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2016. Dengue and Severe dengue. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2017. Dengue and Severe dengue. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>